

O1コレラ菌と共通抗原性を持つnon-cholera vibrioの  
O-抗原リポ多糖(LPS)に関する研究

甲第6号  
1989年

薮 島 由 二

O1コレラ菌と共通抗原性を持つnon-cholera vibrioの  
O-抗原リポ多糖(LPS)に関する研究

1989年

配 島 由 二

# 目 次

## <総論の部>

序 論	1
第 1 章 LPS の化学的性状	6
第 1 節 Non-cholera vibrio LPS の抽出性状と 一般的化学性状	8
第 2 節 LPS の糖組成	10
第 3 節 Non-cholera vibrio LPS からの KDO の検出	14
第 4 節 LPS 多糖体部分(DPS 画分)の分子構築	23
第 5 節 LPS のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリル アミドゲル電気泳動	30
第 6 節 LPS 多糖体部分の糖組成に基づく <u>V. cholerae</u> bio-serogroup Hakata の化学分類	33
第 7 節 Hakata 株 LPS に見出された未同定アミノ糖(AS) の構造確認と Hakata LPS O-抗原特異多糖側鎖 の構造解析	37
第 8 節 LPS の脂肪酸組成とリピド A バックボーン の構造確認	51
考 察	55
第 2 章 LPS の血清学的性状	60
第 1 節 受身溶血反応	60
第 2 節 受身溶血阻止反応	73
第 3 節 N-置換基転換による O1 コレラ菌 LPS の 血清学的性状の変化	78
考 察	86
総 括	88
謝 辞	91

## <実験の部>

一般事項	92
第 1 章に関する実験	95
第 2 章に関する実験	109
引用文献	113



## 総論の部

## [序 論]

コレラ菌 (Vibrio cholerae) は、耐熱性の菌体抗原(O抗原)により O1 グループと non-O1 グループに分類される。このうち、重篤な下痢を主症状とする急性伝染病 "コレラ" の原因菌となるのは O1 グループ・コレラ菌である。我国において、衛生行政上あるいは伝染病予防法で言う "コレラ菌 (cholera vibrio)" とは、O1 コレラ菌に相当する。コレラ菌は、分類学的には Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (第 9 版) [1]において、Family II. Vibrionaceae, Genus I. Vibrio, Species I. Vibrio cholerae として分類されている。また、本菌は生物学的性状の相違により biotype cholera と biotype elton の 2 つの生物型に分類される。Biotype cholera は、アジア型あるいは古典型(classical)とも呼ばれ、インドのベンガル地方を発端とする第 1 次から第 6 次コレラ大流行の際の原因菌である。一方、biotype elton は、1905 年 Gotschich によりエジプト・シナイ半島のトル検疫所で分離された菌であり、当時、エルトルビブリオあるいはパラコレラ菌と呼ばれていたが、生化学的性状がコレラ菌と同一であったことから、現在では Vibrio cholerae の 1 生物型として分類されている。現在も未だ終焉を告げていないセレベス島南部のマカッサル地方を発端とする第 7 次コレラ大流行は、この biotype elton コレラ菌によるものである。

O1 グループ・コレラ菌は、その生物型を問わず O-抗原の部分構造の相違から Inaba 型(本型)と Ogawa 型(異型)に分類され[2]、Inaba 型および Ogawa 型の O-抗原因子は、模式的にそれぞれ A・C, A・B・(c) と表現される[3,4]。これは、O1 コレラ菌の O-抗原構造に関する A・B・C concept として一般的に広く支持されており、A は O1 コレラ菌の共通抗原因子、B は Ogawa 因子、C は Inaba 因子にそれぞれ相当する。non-O1 グループ・コレラ菌は、生物学的性状は O1 グループ・コレラ菌と同一であるが、O-凝集反応性の相違から O1 グループ・コレラ菌とは区別され、その O-抗原型は、少なくとも 82 種に達する[5]。

コレラ菌は本来東南アジアを中心とする地方に常在する水棲細菌であ

り、コレラはこれらの地方で発生する風土病であった。しかし、交通機関の発達に伴い、コレラ常在地域への旅行者の増加や、これらの地域からの生鮮魚介類を材料とする冷凍食品の輸入の増加等に伴い環境衛生施設の整った先進諸国においてもコレラの流行が見られるようになった。また、non-O1 グループ・コレラ菌は、発見当初のスーダンその他におけるような顕著な流行の原因にはならないにしても、集団下痢症を発生させることもあり、特に我国では海外渡航者によって持ち込まれる輸入感染下痢症の大きな原因の 1 つに挙げられている。

我国におけるコレラの流行は昭和に入ってから激減し、昭和 21 年の復興コレラ以降しばらくの間顕著な流行は起こらなかった。しかし、第 7 次コレラ大流行が始まった翌年（昭和 37 年）頃から再興の兆しが見えはじめ、昭和 52 年の有田市におけるコレラ集団発生をかわきりに、鶴見川のコレラ菌汚染（昭和 53 年）、池之端文化センターのコレラ事件（昭和 53 年）等が相次いで発生し、厚生省は公衆衛生学的立場から見たコレラ菌の再認識の必要性を余儀無くされた。また、最近では、東京湾からコレラ毒素遺伝子を持たない O1 コレラ菌（*eltor*・*Ogawa* 型）、いわゆる“無毒性コレラ菌”が分離される（昭和 62 年）などコレラをめぐる諸問題は注目を浴びている。

このような背景の中、近年、O1 コレラ菌と共通抗原性を持った 3 種の O1 コレラ菌とは異なるビブリオ(*non-cholera vibrio*)が相次いで分離された。最初、1982 年、大阪検疫所の定期海水検査で大阪湾の海水から海水ビブリオ *Vibrio bio-serogroup 1875 Original* とその抗原変異株である *Vibrio bio-serogroup 1875 Variant* が分離された。*Vibrio bio-serogroup 1875* は単極毛を持つグラム陰性の桿菌であり形態学的にはコレラ菌と類似していたが、本菌は、リジンおよびオルニチン脱炭酸酵素産生能陰性、アルギニン脱水素酵素産生能陽性、好塩性であることなど生化学的性状がコレラ菌と異なり、また、DNA homologyにおいてもコレラ菌とは明らかな相違が認められた[6]。次に、タイから輸入した冷凍イカから *Vibrio fluvialis* 181-86 Kobe が神戸検疫所によって分離された。本菌の生化学的性状は *V. fluvialis* のそれと同一であった[7]

が、その O-抗原型は、従来 島田・坂崎[8]によって報告された V. fluvialis のどの O-抗原型 (O1~O18) と一致しなかった。第 3 に、1980 年から 1987 年にかけて 31 株の Vibrio cholerae bio-serogroup Hakata が、我国における海水・河川水および輸入冷凍食品から分離された。本菌の生化学的性状は O1 コレラ菌のそれと同一であった [9]。また、本菌は、O1 コレラ菌の共通抗原因子 A は欠損しているが Inaba 因子 C を持っており [9] (後述)、検疫所あるいは衛生研究所での細菌学的検査の際に O1 コレラ菌の A 因子に対するポリクロナル吸収血清あるいは単クローン抗体を使用しない限り Inaba 型 O1 コレラ菌として誤って診断され得る。V. choleare bio-serogroup Hakata は我国において公衆衛生学的見地、特に検疫行政の立場から重要視され、1987 年厚生省によって研究班 (題名: 細菌学の進歩に応じたコレラ菌の行政上の取扱いの見直し。 班長: 三輪谷俊夫教授・大阪大学微生物病研究所長) が設立され、Hakata group や コレラ毒素非産生性 O1 コレラ菌等の衛生行政上の取扱いに関する検討が成された。

島田ら [6,7,9] は、O1 コレラ菌とこれらの non-cholera vibrio との抗原関係を凝集反応および凝集素吸収反応により検討した結果、これらの菌株は O1 コレラ菌の Ogawa 因子 B および Inaba 因子 C の両者あるいは Inaba 因子 C のみを持つが、O1 コレラ菌の共通抗原因子 A は全て欠損していることを見出した。さらに島田らは、これら 3 つの non-cholera vibrio に D 因子が共通して存在し、Vibrio bio-serogroup 1875 Original, Variant および V. fluvialis 181-86 Kobe に E 因子が、また、V. choleare bio-serogroup Hakata には F 因子が存在することを明らかにした。従って Fig. 1 に示すように、Vibrio bio-serogroup 1875 Original, 1875 Variant, V. fluvialis 181-86 Kobe および V. cholerae bio-serogroup Hakata の O-抗原構造式は、それぞれ B·(c)·D·E, C·D·E, C·D·E, および C·D·F となる。O1 コレラ菌の Ogawa 因子 B と Inaba 因子 C の存在、および共通抗原因子 A の欠損は、これら 3 つの抗原因子の各々に対する因子血清と単クローン抗体を使用することによっても確認された。

# O1 *Vibrio cholerae*

Ogawa	A	B	(c)
Inaba	A		C

## *Vibrio* bio-serogroup 1875

Original	B	(c)	D	E
Variant		C	D	E

*Vibrio fluvialis* 181-86 Kobe C D E

*Vibrio cholerae* bio-serogroup Hakata C D F

Fig. 1 Antigenic structures of O1 *V. cholerae* and non-cholera vibrios possessing an antigenic factor in common with O1 *V. cholerae*.

グラム陰性細菌の細胞壁は、基本的に 2 つの構造単位から構築されている。1 つは細胞壁内層に位置し、その強固な化学構造によって細菌細胞に剛直性と形状を附与しているペプチドグリカン層（あるいは Rigid 層）であり、他の 1 つはペプチドグリカン層の外側を覆って細菌細胞と外界を隔てている細胞壁外膜である。細胞壁外膜はリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、タンパクおよびリン脂質から構成されてるが、これらの構成成分のうち、グラム陰性細菌の O-抗原特異性を決定する因子は、細胞壁外膜の outer leaflet に局在する LPS であることが知られている。

LPS に関する研究は、主に、サルモネラや大腸菌等について活発に行われ、これらの細菌の LPS の化学構造および各細菌の O-抗原型を決定するエピト-プの解明も数多く成されている [11, 12, 13, 14]。しかし、コレラ菌 LPS に関する研究 [15, 16, 17, 18, 19] は、サルモネラや大腸菌のそれと比較して、非常に遅れているのが現状であり、O1 コレラ菌のただ 2 つの抗原型である Ogawa 型 と Inaba 型を決定する LPS 分子上の O-抗原特異性決定部位の構造については未だ解明されていない。

本研究では、分類学的・公衆衛生学的に興味深い上記 3 種の non-cho-

lera vibrio の LPS を用いて O1 コレラ菌 LPS の抗原特異性決定部位を解明することを最終目的とし、以下に示す実験を行った。

(1) O1 コレラ菌 Inaba 型と Ogawa 型, Vibrio bio-serogroup 1875 Original とその Inaba 変異株 1875 Variant, V. fluvialis 181-86 Kobe, V. cholerae bio-serogroup Hakata および Inaba 型コレラ菌と交叉することが知られている Yersinia enterocolitica O9 から分離・精製した O-抗原リポ多糖 (LPS) の主に糖組成と化学的分子構築を中心とする化学的性状を明らかにして、これらを比較検討した。

(2) 各菌株に対する全菌血清、A, B, C, D, E, F に対する各因子血清を用いた受身溶血および受身溶血阻止反応を行い、これら LPS の血清学的交叉反応原性について検討するとともに、(1) で得られた結果と合わせ、O1 コレラ菌抗原構造の化学的背景に対する解析を試みた。

(3) 公衆衛生学的見地から、我国において分離された 31 株の V. cholerae bio-serogroup Hakata の LPS 多糖部の糖組成を検討し、Hakata 株 と O1 コレラ菌の化学的判別を行った。

## 第 1 章 LPS の化学的性状

グラム陰性細菌のO-抗原特異性を決定する因子は、細胞壁外膜の outer leaflet に局在するリポ多糖体 (lipopolysaccharide, LPS) である。また、LPS は、グラム陰性細菌の O-抗原性を決定するばかりでなく、細菌内毒素としての発熱原性、致死毒性等の多彩な生物活性を発現する。Fig. 2 に示すように、LPS は、基本的には O-抗原特異多糖側鎖、コアオリゴ糖およびリピド A の 3 つの部分から構成されている [10]。O-抗原特異多糖側鎖は、一般に、3~6 個の糖質(repeating unit)が反復重合した多糖ポリマーで構成され、その糖質の種類と結合様式により細菌の O-抗原特異性が決定される。リピド A は、LPS の持つ様々な内毒素活性の本体であり、一般に  $\beta$  (1'→6) 結合のグルコサミン 2 量体をバックボーンとし、その 2, 2' 位のアミノ基と 3, 3' 位の水酸基に高級脂肪酸が、また、1, 4' 位の水酸基にリン酸がそれぞれ結合した構造を持っている。また、コアオリゴ糖は、上記の 2 つの部分、すなわち O-抗原特異多糖側鎖とリピド A を結合する部位であり、多くのグラム陰性細菌

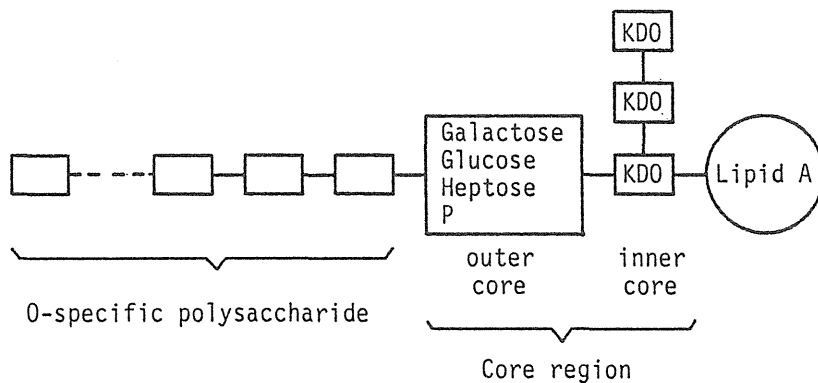


Fig. 2 Schematic structure of gram-negative bacterial lipopolysaccharide (LPS)

LPS では自然界に稀少な糖である 2-keto-3-deoxy-octonate (KDO), ヘプトース, グルコースおよびガラクトースなどから構成されている。KDO は、LPS の多糖体部分とリピド A 部分を連結するとともに、LPS の持つ化学的特性、特に酸に対する不安定性やコア部分の免疫学的特異性等に関して重要な役割を荷っている。また、一般に、Fig. 2 に示した O-抗原特異多糖側鎖、コアオリゴ糖およびリピド A の 3 つの基本部位からなる LPS は Smooth (S) 型 LPS と称せられ、一方、これらの基本部分のうち、O-抗原特異多糖側鎖部位を欠損した LPS は Rough (R) 型 LPS と呼ばれている。

O-抗原多糖側鎖の化学構造は、この 10 数年間に、サルモネラ、赤痢菌および大腸菌を中心に、かなりの数の LPS で明らかにされた[11]。特に、サルモネラ、および大腸菌では、その O-抗原型に対応する O-抗原決定基の化学構造の解明も成されている [12,13]。また、*Salmonella typhimurium* では、LPS の生合成における種々の段階の遺伝的欠損により生じた数種の R 変異株の LPS を用いた研究により、LPS の O-抗原側鎖およびコア部分の化学構造が明らかにされている [14]。一方、O1 コレラ菌 LPS の O-抗原特異多糖側鎖部分は、主に、 $\alpha 1 \rightarrow 2$  結合のペロサミン・ホモポリマーによって構成されていることが、Redmond [15], Kenne ら [16,17], 久恒ら [18,19]等により示されたが、O1 コレラ菌のただ 2 つの O-抗原型、Inaba 型と Ogawa 型を決定する LPS 分子上の O-抗原決定部位の化学構造は未だに解明されていない。

本章においては、O1 コレラ菌 LPS の抗原特異性決定部位の解明に寄与する目的で、O1 コレラ菌と共通抗原征を持つ 3 種の non-cholera vibrio から分離・精製した LPS の化学的性状を追究し、これらの LPS と O1 コレラ菌 LPS との関連性について検討した。また、公衆衛生学的見地から、本邦で分離された 31 株の Hakata 株について、LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類を行い、本菌と O1 コレラ菌との判別を試みた。



## 第 1 節. Non-cholera vibrio LPS の抽出性状と一般的化学組成

グラム陰性細菌からの LPS の抽出は、Boivin らのトリクロル酢酸抽出法[50]を初めとする多くの研究が基礎となり、現在では、Smooth (S) 型 LPS の抽出には Westphal のフェノール・水抽出法 [21] が、また、Rough (R) 型 LPS の抽出には Galanos らのフェノール・クロロホルム・石油エーテル (PCP) 抽出法[20]がそれぞれ汎用されている。LPS は、一般に、その物理化学的性状の差異により、上記の 2 つの抽出法のいずれかで抽出され、また、フェノール・水法においては、その水層から抽出されるが、本研究に用いた各菌株からの LPS の抽出性状には大きな特徴が見られた。

Vibrio bio-serogroup 1875 Original と Variant の LPS は、共にフェノール・水法によって抽出された。そのアセトン乾燥菌体からの収率は共に 0.5% であり、O1 コレラ菌の場合に比べて非常に低かった。また、両菌株からは、PCP 抽出において未知物質 (non-LPS material, NL) が得られた。V. fluvialis 181-86 Kobe では、一般の S 型グラム陰性細菌の場合と異なり、PCP 法によって R 型菌と同様に LPS (Kobe PCP-LPS) が抽出され (収率 0.4%)、さらに、その抽出残渣の菌体からは、フェノール・水法によって通常の如く水層から LPS (Kobe water phase LPS, Kobe W-LPS) が抽出された (収率 0.6%)。一方、V. cholerae bio-serogroup Hakata からは、PCP 法では LPS は分離されなかったが、フェノール・水法の水層から他の S 型グラム陰性細菌と同様に LPS (Hakata water phase LPS, Hakata W-LPS) が 3.5% の高収率で抽出され、さらにフェノール層からも LPS (Hakata phenol phase LPS, Hakata P-LPS) が分離された (収率 2.4%)。各菌株から分離・精製した LPS と 1875 株から得られた NL の一般的化学組成を Table 1 に示した。これら 3 種の non-cholera vibrio の LPS は、一般グラム陰性細菌 LPS (Salmonella typhimurium LT2 LPS, Table 1) と類似した基本的化学組成を持っていたが、O1 コレラ菌 LPS (Table 1) と同様に、その全糖質含量は約 15~25% と低く、全体としての回収率も約 50~70% と低いのが特徴であった。また、1875 株か

Table 1. Chemical composition of LPS isolated from Salmonella, 01 V. cholerae and non-cholera vibrios possessing an antigenic factor in common with 01 V. cholerae (% w/w).

LPS	Yield <sup>a)</sup>	Total Carbohydrate	Reducing sugar	Total Amino sugar	Total lipid	Total phosphorus
<u>S. typhimurium</u> LT2 LPS	1.5	53.0	33.8	3.7	28.9	2.3
01 <u>V. cholerae</u>						
NIH 41 (Ogawa) LPS	3.3	28.4	23.7	8.1	19.9	1.9
569B (Inaba) LPS	2.1	30.4	21.9	8.1	24.4	1.6
1875 Original LPS	0.5	15.7	26.3	9.4	18.0	2.4
1875 Variant LPS	0.5	16.5	26.7	7.9	20.0	2.0
1875 Original NL <sup>b)</sup>	0.4	0.8	0.5	0.9	44.0	7.3
1875 Variant NL	0.3	2.5	3.2	2.7	52.0	7.0
<u>V. fluvialis</u> Kobe						
water phase LPS	0.6	22.0	25.6	9.4	19.0	1.7
PCP LPS	0.4	23.1	21.7	7.4	30.0	2.8
<u>V. cholerae</u> Hakata						
phenol phase LPS	2.4	18.8	21.3	8.0	29.0	2.1
water phase LPS	3.5	24.9	25.5	11.5	31.0	2.7

a) Yield, from acetone dried-cells (% w/w). b) NL, non-LPS material isolated from Vibrio bio-serogroup 1875 cells by phenol/chloroform/petroleum ether extraction. Total carbohydrate, reducing sugar, total amino sugar and total phosphorus were estimated by colorimetric analysis according to method of Dubois et al. [31], Momose et al. [34], Belcher et al. [35] and Hisatsune et al. [33]. Total lipid was estimated by weighing ether-soluble fraction after acid hydrolysis in 4 M-HCl at 100°C for 4 hr.

ら PCP 法により抽出された NL は、リンおよび脂質含量が高く水不溶性であり、糖質含量が極めて低いなど LPS とは極端に異なる化学組成を持っていた (Table 1)。久恒らのグループがこれまでに数多くのビブリオ科細菌について PCP 抽出を行ってきた中で、このような物質が得られたのはこの両株が初めてである。

この特徴的な LPS の抽出性状は *Yersinia enterocolitica* O9 についても観察され、フェノール・水抽出法の水層とフェノール層から抗原特異性の異なる LPS が分離されることが知られている [45] が、本研究で取り上げた O1 コレラ菌と共通抗原性を持つ 3 種の non-cholera vibrio の LPS の抽出に際して通常の S 型グラム陰性細菌と異なる特徴的な性状が観察されたのは興味あることである。

## 第 2 節. LPS の糖組成

久恒らは、数株の O1 コレラ菌から分離・精製した LPS の糖組成を検討した結果、Ogawa 型 および Inaba 型を問わず、O1 コレラ菌 LPS は特異糖として 4-amino-4,6-dideoxy-mannose (ペロサミン), 2-amino-2,6-dideoxy-glucose (キノボサミン) およびフルクトースを含むことを明らかにした [18,19]。また、S 型 O1 コレラ菌が R 型に変異してその O1 特異性を失うと、その LPS からペロサミンとキノボサミンも同時に消失することから、この 2 つの稀少糖がコレラ菌の O1 特異性に抗原的に不可欠に関与していることを示した [18,19]。さらに久恒らは、Murphy ら [51] によって O1 コレラ菌 569B (Inaba) から分離された hypotoxinogenic mutant (*tox* 101-TI-N4) の LPS 糖組成を検討した結果、本 LPS はペロサミンとキノボサミンのうちペロサミンのみを欠損していたことから、O1 コレラ菌 LPS の糖配列において、ペロサミンはキノボサミンよりもコア部分 (Fig. 2) から離れた非還元末端側に存在することを明らかにしている [52]。本実験では、O1 コレラ菌と共通抗原性を持つ 3 種の non-cholera vibrio から分離・精製した LPS の糖組成を O1 コレラ菌 LPS のそれと比較検討した。

Vibrio bio-serogroup 1875 Original と Variant, V. fluvialis 181-86 Kobe および V. cholerae bio-serogroup Hakata から分離・精製した LPS の定量的糖組成を Table 2 に示した。対照として、久恒らにより報告されている O1 コレラ菌 P1418 (Ogawa) およびその Inaba 変異株 (P1418-UV601) と R 変異株 (P1418-R)、および tox 101-TI-N4 から分離・精製した LPS の糖組成 [18,52] を示した。表の各数値は、Kobe 株以外の菌株では、L-グリセロ-D-マンノヘプト-スの含量を 3 モル、また、Kobe 株の場合では L-グリセロ-D-マンノヘプト-ス と D-グリセロ-D-マンノヘプト-スの総含量を 3 モルとした際の各糖成分のモル数を示している。

## 2-1. Vibrio bio-serogroup 1875 LPS の糖組成

Table 2 に示したように、1875 Original と Variant の LPS はほぼ同一の糖組成を示した。両菌株の LPS は、ペロサミン、キノボサミン、フルクト-ス、グルコース、L-グリセロ-D-マンノヘプト-ス および グルコサミンを含み O1 コレラ菌 LPS と類似した糖組成を示したが、O1 コレラ菌 LPS の構成糖以外にもマンノ-スと中性糖画分に 2 つの未同定物質 (NS I, NS II) を含んでおり、中性糖組成において O1 コレラ菌 LPS との相違が認められた。1875 株 LPS の NS I・NS II 含量は、それぞれ 3.2~3.8%, 8.4~9.2% であった。プログラム 4 (実験の部 Table E-5) を用いた ガスクロマトグラフィー (GLC) 分析における NS I と NS II のアルジトル・アセテート誘導体のキシロ-スに対する相対保持時間は、それぞれ 1.80 と 2.48 であったが、これらの物質の同定に関しては現在検討中である。

## 2-2. V. fluvialis 181-86 Kobe LPS の糖組成

Table 2 に示したように、Kobe W-LPS と Kobe PCP-LPS は、共通構成糖としてグルコース、ガラクト-ス、L-グリセロ-D-マンノヘプト-ス、D-グリセロ-D-マンノヘプト-ス、グルコサミン、ガラクトサミンおよびウ

Table 2. Sugar composition of LPS isolated from *V. cholerae*, *Vibrio* bio-serogroup 1875, *V. fluvialis* 181-86 Kobe and *Y. enterocolitica* 09 (molar ratio)

	Glc	Gal	Man	NS <sup>a)</sup>		Fru	Hep	GlcN	GalN	QuiN	PerN	AS <sup>b)</sup>	Uronic acid	KDO
				I	II									
P1418 (Ogawa)	1.0	—	—	—	—	0.8	3.0	1.6	—	0.6	8.4	—	—	nd <sup>d)</sup>
P1418-UV601 (Inaba)	0.9	—	—	—	—	0.8	3.0	1.4	—	1.1	12.0	—	—	nd
tox 101-TI-N4	1.2	—	—	—	—	0.1	3.0	1.7	—	0.5	—	—	—	nd
P1418-R	1.4	—	—	—	—	1.4	3.0	1.7	—	—	—	—	—	nd
1875 Original	1.6	—	0.1	+	+	1.9	3.0	2.0	—	0.4	1.2	—	—	nd
1875 Variant	1.9	—	0.2	+	+	2.1	3.0	2.0	—	0.4	1.2	—	—	nd
<i>V. fluvialis</i> 181-86														
water phase LPS	3.0	0.1	0.1	+	+	—	3.0	2.0	0.1	0.4	0.6	—	4.5	nd
PCP-LPS	1.2	0.1	—	—	—	—	3.0	1.9	0.1	—	—	—	4.1	nd
Hakata 487-85														
phenol phase LPS	2.8	1.4	0.7	—	—	1.5	3.0	2.1	—	1.3	0.8	6.7	—	nd
water phase LPS	3.0	1.5	0.1	—	—	1.8	3.0	2.6	0.2	tr	tr	tr	—	nd
<i>Y. enterocolitica</i> 09	2.0	tr <sup>c)</sup>	—	—	—	—	3.0	1.9	0.1	—	—	—	—	0.8

The data represent the molar ratios of the component sugars found in LPS, the values being calculated on the basis of the assumption that LPS contains 3 moles of heptose. Abbreviations: Glc, glucose; Gal, galactose; Man, mannose; Fru, fructose; Hep, heptose; GlcN, glucosamine; GalN, galactosamine; QuiN, quinovosamine; PerN, perosamine; KDO, 2-keto-3-deoxyoctonate. a) NS, unknown neutral sugar. b) AS, unknown amino sugar. c) tr, trace amount, less than 0.1 mole. d) nd, not detected by Weissbach's periodate/thiobarbituric acid reaction (37) under conventional hydrolysis conditions.

ロン酸を含んでいた。両 LPS における L-グリセロ-D-マンノヘプトースと D-グリセロ-D-マンノヘプトースの含量比は、共に約 1:2 であった。さらに、Kobe W-LPS は、O1 コレラ菌 LPS の特異糖であるペロサミンとキノボサミン、および 1875 株 LPSに見出されたマンノース、NS I, NS II を含んでおり、O1 コレラ菌 および 1875 株 LPS とも若干類似した糖組成を示した。Kobe W-LPS における NS I, NS II の含量は、それぞれ 2.1%, 8.5% であった。O1 グループ、non-O1 グループを問わずコレラ菌 LPS に広く分布するフルクトースは、Kobe W- および Kobe PCP-LPS には含まれていなかった。また、Kobe PCP-LPS は、ペロサミン、キノボサミン、マンノース、NS I および NS II を含まないことから、R 型の LPS である可能性が示された。

### 2-3. V. cholerae bio-serogroup Hakata LPS の糖組成

Table 2 に示したように、Hakata P-LPS は、ペロサミン、キノボサミンおよびフルクトースをはじめ O1 コレラ菌 LPS の全ての構成糖を含んでいた。また、Hakata P-LPS は、O1 コレラ菌 LPS の構成糖以外の糖質としてガラクトースと多量の未同定アミノ糖 (AS) および 1875 株 LPS と Kobe W-LPS に見出されたマンノースを含んでいた。Hakata W-LPS は、グルコース、ガラクトース、マンノース、L-グリセロ-D-マンノヘプトースおよびグルコサミンを含んでいたが、ペロサミン、キノボサミン、および Hakata P-LPS に見出された AS を殆ど含んでおらず、R 型の LPS であることが予想できた。1875 株 LPS と Kobe W-LPS に見出された NS I, NS II は、Hakata P- および W-LPS からは検出されなかった。Hakata P-LPS に存在する AS に関しては後述する。

以上のように、O1 コレラ菌と共通抗原性を持つこれら 3 株の全ての LPS にペロサミンとキノボサミンが存在することが認められた。また、ガラクトース、マンノース、フルクトース、未同定物質 (NS I, NS II) および未同定アミノ糖 (AS) の各菌種における分布パターンに、菌種特異性があることが明らかになった。

Inaba 型コレラ菌と血清学的に交叉することが知られている *V. enterocolitica* O9 から分離・精製した LPS (phenol phase LPS) は、ペロサミンとキノボサミンのペア-のうち、ペロサミンのみを多量に含んでいた (Table 2)。また、1875 株, Kobe 株および Hakata 株 LPS からは、一般グラム陰性細菌 LPS の特異的常成分である 2-keto-3-deoxy-octonate (KDO) が、温和な条件下 (0.01M 硫酸・100°C・20 分) に加水分解を行う Weissbach の過ヨウ素酸・チオバルビツ-ル酸反応 [37] により検出できなかった (Table 2)。

### 第 3 節. Non-cholera vibrio LPS からの KDO の検出

久恒らは、ビブリオ科細菌 LPS では、極く少数例を除き温和な条件下に加水分解を行う Weissbach の方法 [37] によって KDO は検出されないが、LPS を強酸で加水分解すると過ヨウ素酸・チオバルビツ-ル酸反応に陽性となることを見出した [19, 53]。また、久恒らは、高圧濾紙電気泳動実験により、ビブリオ科細菌 LPS の強酸加水分解液中に存在する過ヨウ素酸・チオバルビツ-ル酸反応陽性物質は KDO のリン酸化誘導体であることを示している [19, 53]。本実験では、*Vibrio* bio-serogroup 1875, *V. fluvialis* 181-86 Kobe および *V. cholerae* bio-serogroup Hakata の各 LPS におけるリン酸化 KDO の存在の有無を高圧濾紙電気泳動と GLC 分析により検討した。

*Vibrio* bio-serogroup 1875, *V. fluvialis* 181-86 Kobe および *V. cholerae* bio-serogroup Hakata の各 LPS は、前処理を行わない場合 Weissbach の反応に陰性 (Table 2) であったが、LPS を強酸で処理 (4M 塩酸・100°C) した後の加水分解産物は同反応に陽性となった。Fig. 3 に示すように、この反応液の最大吸収波長は、標準の KDO および O1 コレラ菌 LPS のそれと同一の 549 nm であった。Fig. 4 に示したように、これらの LPS からの過ヨウ素酸・チオバルビツ-ル酸反応陽性物質 (X) の遊離は LPS を 4M 塩酸で 100°C, 45 分間加水分解することにより最大に達し、その後、加水分解時間の延長とともに漸次減少した。また、対

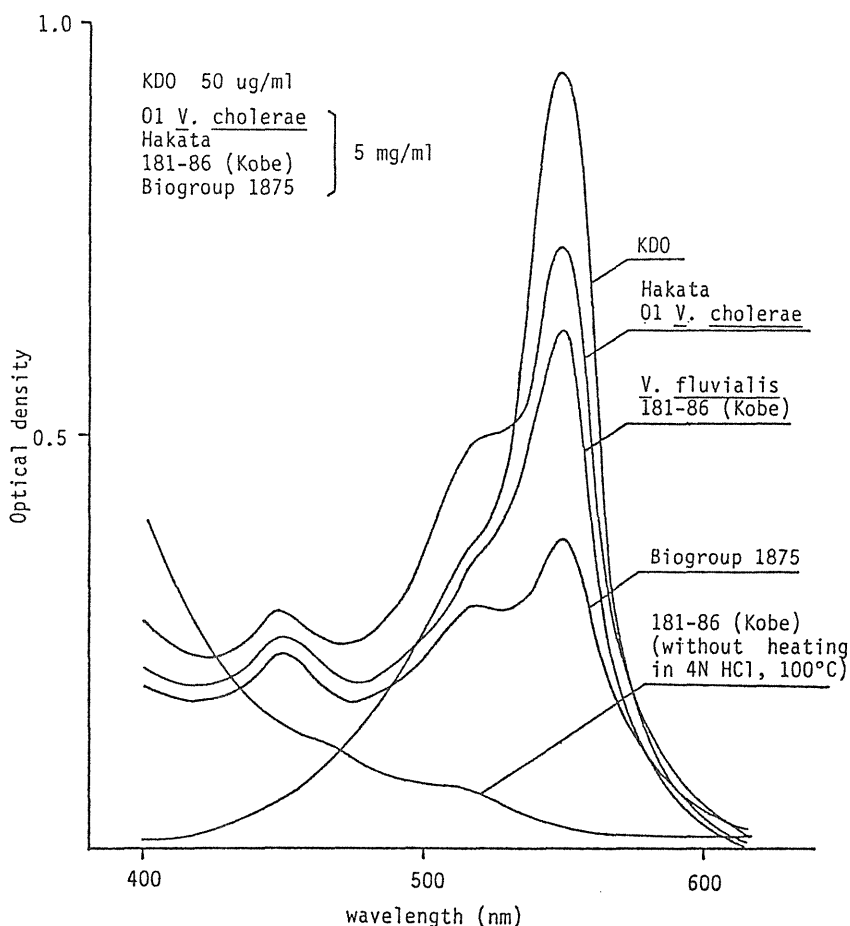


Fig. 3. Absorption spectra of color produced by KDO and periodate/thiobarbituric acid reaction positive-substances (X) present in *V. cholerae*, *Vibrio* bio-serogroup 1875 and *V. fluvialis* 181-86 Kobe LPS.

照として用いた KDO は、同加水分解条件下ですみやかに分解された。

しかし、Fig. 5 に示したように、これらの LPS の強酸加水分解物中に見出された未知物質 X は、高圧濾紙電気泳動において標準の KDO と異なる移動度を示した。Hakata 株 LPS の強酸加水分解物に含まれる X は高圧濾紙電気泳動において移動度の異なる 2 つの物質に分れた。それぞれの物質の KDO に対する相対移動度( $R_{KDO}$ )は、1.54 と 1.80 であり、O1 コレラ菌 LPS の強酸加水分解物から得られた X1 と X2 のそれと完



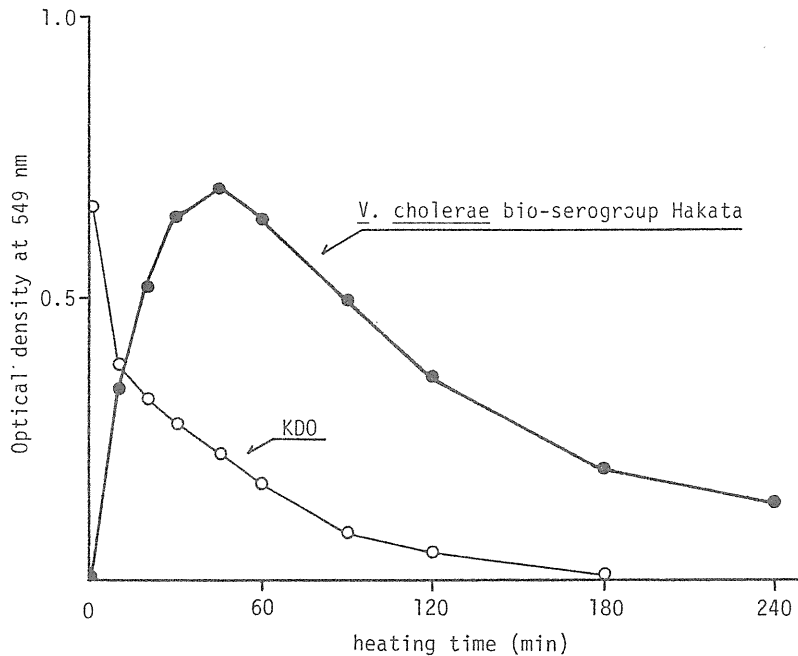


Fig. 4. Release of periodate/thiobarbituric acid reaction positive-substance (X) from *V. cholerae* bio-serogroup Hakata LPS by heating in 4M HCl at 100°C.

全に一致していた。また、このうち低移動度の物質は、Chaby and Szabo の報告 [54] に基づいて *Bordetella pertussis* phase I LPS から分離した 5-0-phosphoryl KDO と同一の移動度を持っていた。一方、1875 株および Kobe 株 LPS に見い出された X は、高圧濾紙電気泳動において、2 つの物質に分離されなかったが、本 X の  $R_{KDO}$  は、O1 コレラ菌 LPS の X1 および *B. pertussis* LPS 由来の 5-0-phosphoryl KDO のそれと同一であった。

これらの LPS から分離した X と *B. pertussis* LPS から単離した 5-0-phosphoryl KDO をアルカリ性ホスファターゼで処理した後では、Fig. 5 に示すように、5-0-phosphoryl KDO および X1 と X2 に相当するスポットは消失し、新に KDO と同じ移動度を示す物質が検出された。この物質を単離し、箱守の方法[40]によって完全メチル誘導体としてガスク

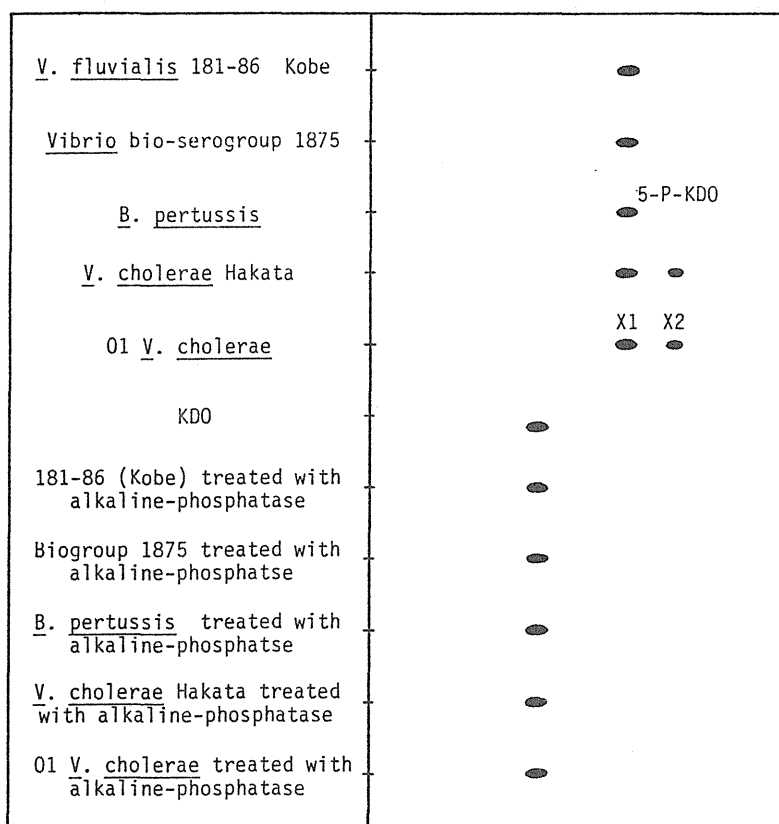


Fig. 5. High-voltage paper electrophoretic behaviors of 5-O-phosphoryl KDO from B. pertussis LPS and the periodate/thiobarbituric acid reaction positive-substances (X) present in the strong acid hydrolysate of V. cholerae, Vibrio bio-serogroup 1875 and V. fluvialis 181-86 Kobe LPS before and after treatment with alkaline phosphatase. Spots were colorized with periodate-thiobarbituric acid reagent for KDO.

ロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)を行った結果、Fig. 6 に示したように m/e 293, 217, 205, 173, 161, 145, 129, 101, 89 等のイオンフラグメントが観察され、本誘導体は、標準の KDO の完全メチル誘導体と同一のマススペクトルを示した。また、O1コレラ菌および 1875 株, Kobe 株 および Hakata 株の各 LPS をメタノリシスした後、ジアゾメタン および ピリジン・無水酢酸で処理して、メチル・アセチル誘導体を調製し、プログラム 4 (実験の部 Table E-5) を用いる GLC により分析した結果、

保持時間 25.3分 と 25.6 分に mono-phosphoryl KDO に由来すると思われる 2 つのピークが検出された。それぞれのピークに由来する物質を K-1, K-2 と仮称する。GLC 分析において各 LPSから検出された K-1 と K-2 の量比は、約 1 : 0.7~0.9 であった。また、K-1, K-2 に相当する物質は、各 LPS から分離した X を同様の方法で分析することによっても検

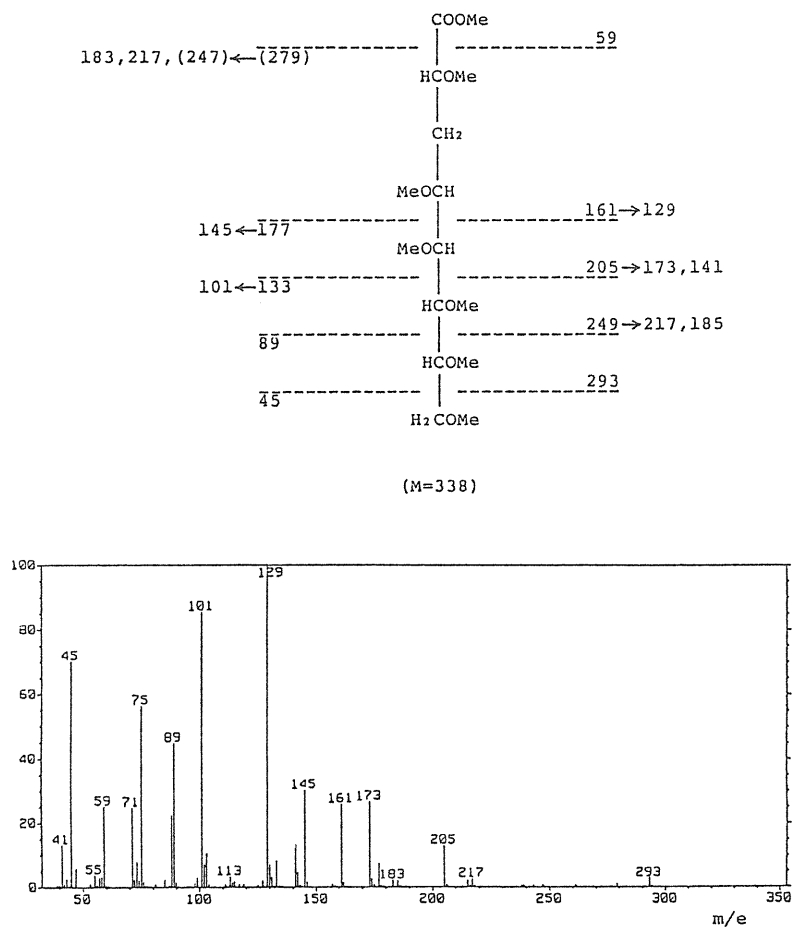


Fig. 6. Mass spectrum of the permethylated derivative of the periodate/thiobarbituric acid reaction positive-substance (X) from *V. cholerae* bio-serogroup Hakata LPS after treatment with alkaline-phosphatase. The condition on GC/MS analysis; program 4 in Table E-5 shown in experimental part.

出できた。Fig. 7 に示したように、K-1 と K-2 の Chemical Ionization/Mass spectrometry (CI-MS)では、ともに、mono-phosphoryl KDO のメチル・アセチル誘導体の分子イオン(M)に相当する  $m/e$  501 ( $M+1$ )のイオンフラグメントが検出されたが、K-1 では  $m/e$  409、K-2 では  $m/e$  343 のイオンフラグメントがそれぞれ高感度で観察されるなど、 $m/e$  300~

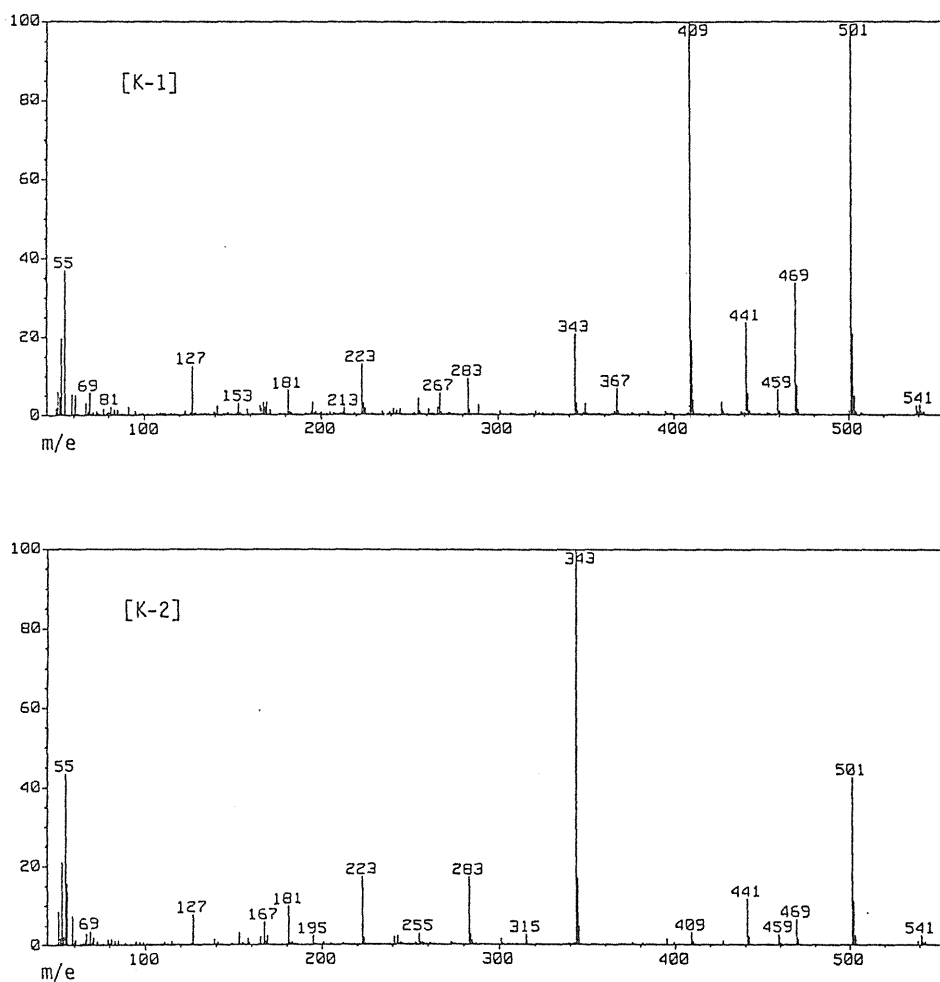


Fig. 7. Mass spectra on CI-MS of partially methylated and acetylated derivative (K-1 and K-2) of O-phosphoryl KDO from *V. cholerae* bio-serogroup Hakata LPS. The condition on GC/MS analysis; program 5 in Table E-5 shown in experimental part.

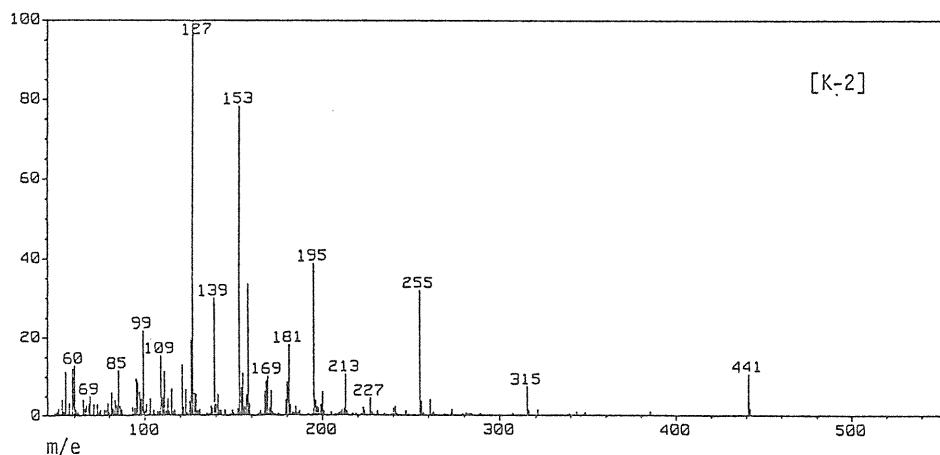
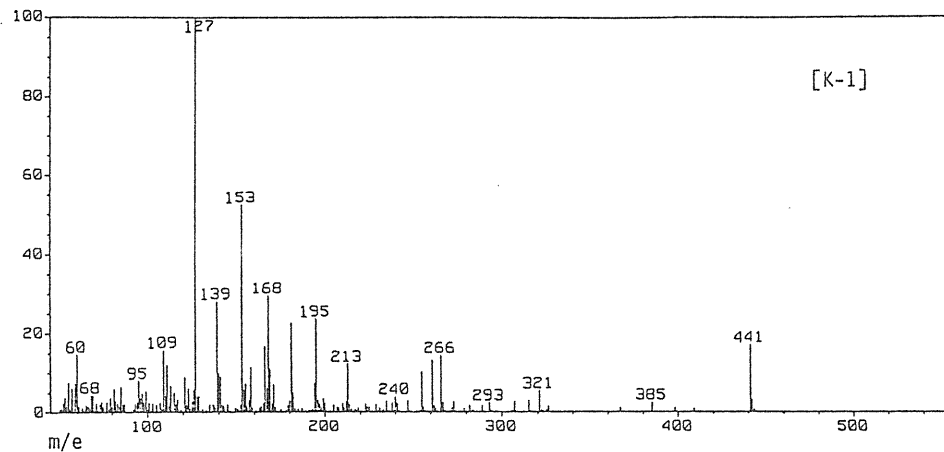


Fig. 8. Mass spectra on EI-MS of partially methylated and acetylated derivative (K-1 and K-2) of O-phosphoryl KDO from *V. cholerae* bio-serogroup Hakata LPS. The condition on GC/MS analysis; program 5 in Table E-5 shown in experimental part.

500 の範囲において両者間に相違が認められた。また、Fig. 8 に示したように両物質の Electron Impact/Mass Spectrometry (EI-MS) におけるマススペクトルは、非常に類似していたが、 $m/e$  240~400 の範囲に若干の相違がみられた。また、K-1, K-2 の EI-MS におけるマススペクトルは、久恒らのグループと共同研究を行っている Rietschel らのグループ

(Forschungsinstitut Borstel, West Germany) により測定された 5-0-phosphoryl KDO および 4-0-phosphoryl KDO の化学合成標品のメチル・アセチル誘導体のマススペクトルとほぼ一致していた。Rietschel らの研究グループは、4-0-phosphoryl KDO と 5-0-phosphoryl KDO は、高圧濾紙電気泳動において同一の移動度 ( $R_{KDO} = 1.54$ ) を示し、また、強酸処理あるいはメタノリシスに伴い 4 - 5 位間でリン酸基の転移反応が起きることを見出した。本実験により、O1 コレラ菌および 1875 株, Kobe 株, Hakata 株 LPS の強酸加水分解物中に見出された未知物質 X は、KDO のリン酸化誘導体であることが明らかとなり、特に X1 は、4-0-phosphoryl KDO と 5-0-phosphoryl KDO の混合物であることが示された。しかし、前述したように、4-0-phosphoryl KDO と 5-0-phosphoryl KDO 間には強酸処理あるいはメタノリシスに伴うリン酸基の転移反応が起きるため、Intact の LPS 分子に存在するリン酸化 KDO のリン酸基の結合位置を決定するにはさらに検討が必要である。そこで、Intact LPS における KDO 分子の隣接糖との結合様式を検討するため、脱リン酸、脱脂肪酸、カルボキシル基還元および重水素標識など種々の化学処理を施した LPS を用いてメチル化分析を行った結果、プログラム 4 (実験の部 Table E-5) による GC/MS 分析において保持時間 16.3 分に、LPS 多糖体部分の還元末端糖として重水素標識された 1,2,5,6-tetra-0-acetyl-4,7,8-tri-0-methyl-3-deoxy-octitol と思われる物質 (Fig. 9) が検出され、他の 3-deoxy-octitol のメチル・アセチル誘導体は検出できなかった。一般グラム陰性細菌 LPS に含まれる KDO は、通例、ピラノースであり、ヘプトース [1→5] KDO [2→6] リピド A バックボンの結合様式により、LPS の多糖体部分とリピド A 部分とを連結している [64]。上述の如く、種々の化学処理を施した LPS のメチル化分析において、LPS 多糖体部分の還元末端糖として重水素標識された 1,2,5,6-tetra-0-acetyl-4,7,8-tri-0-methyl-3-deoxy-octitol が検出されたことから、3 種の non-cholera vibrio の LPS に含まれるリン酸化 KDO は、一般グラム陰性細菌 LPS の場合と同様、LPS 多糖体部分 [1→5] リン酸化 KDO [2→6] リピド A バックボンの結合様式により LPS 多糖体部分とリピド A 部分とを連結しているこ

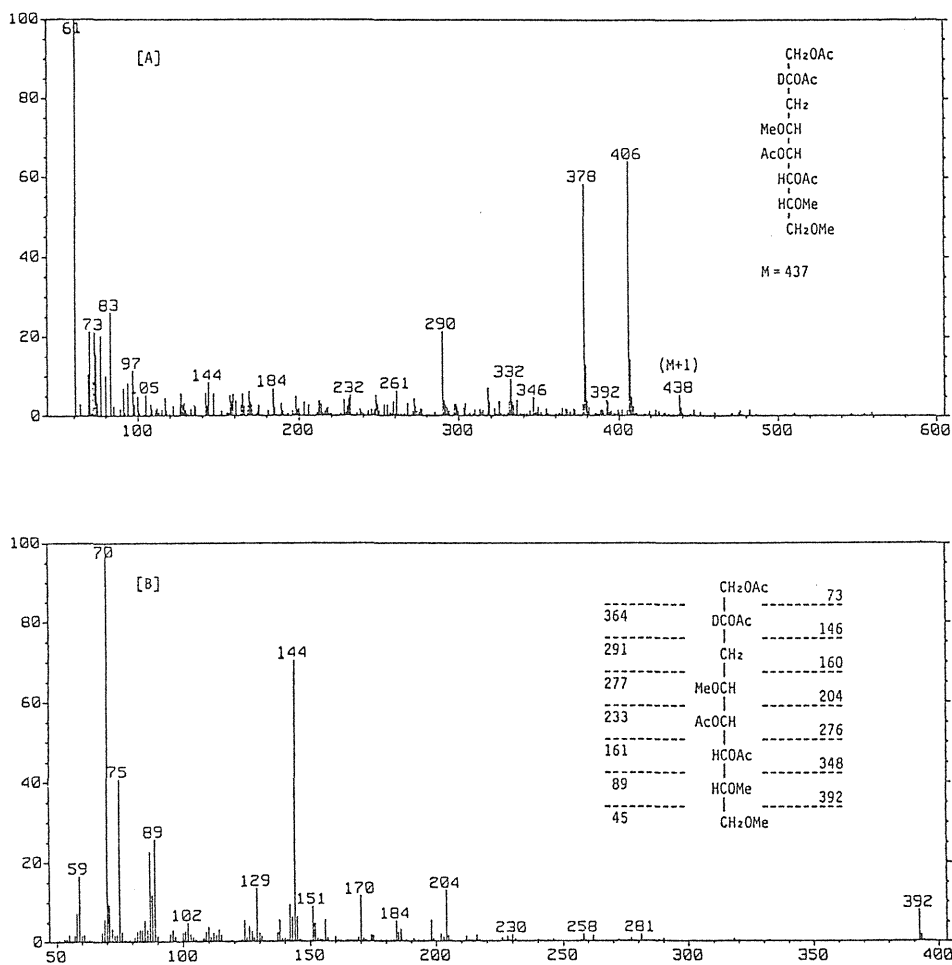


Fig. 9. Mass spectra of 1,2,5,6-tetra-O-acetyl-4,7,8-tri-O-methyl-[2-<sup>2</sup>H]-octitol in [A] CI-MS and [B] EI-MS. The condition on GC/MS analysis; program 4 in Table E-5 shown in experimental part.

とが示された。すなわち、これらの LPS に存在するリン酸化 KDO の 5 位の水酸基は、 隣接糖との結合に使用されているため、リン酸基の結合部位は 4 位と思われる。従って、これらの結果から、1875 株, Kobe 株 および Hakata 株 LPS に存在するリン酸化 KDO は 4-O-phosphoryl-KDO であり、 先の実験で検出された 5-O-phosphoryl-KDO は、強酸処理・メ

タノリシスにより 4-O-phosphoryl-KDO から誘導された産物であることが示唆された。

#### 第 4 節. LPS 多糖体部分(DPS 画分)の分子構築

グラム陰性細菌 LPS の多糖体部分の分子構築は、部分加水分解により LPS から分離した degraded polysaccharide (DPS)画分をゲルクロマトグラフィーにより分画し、得られた各画分の構成糖の分布パターンを検討することにより知ることができる。本実験では、この方法を用いて 1875 株, Kobe 株 および Hakata 株 LPS の多糖体部分の分子構築を検討した。

##### 4-1. DPS 画分の Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーにおける溶出パターン

サルモネラや大腸菌のような一般グラム陰性細菌の LPS は、弱酸加水分解により、多糖体部分(DPS)とリピド A 部分を連結する KDO のケトシド結合が切断され、DPS とリピド A に分解される[10]。この DPS は、Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーにおいて、その排除容量 (void volume)に溶出してくるコアオリゴ糖の結合した O-抗原特異多糖側鎖画分(Frc. I), imbibed volume に溶出するコアオリゴ糖画分 (Frc. III) および 殆ど bed volume 近くに溶出する遊離の KDO とリン酸画分 (Frc. IV) の 3 つの画分に分画される(Frg. 10 A) [10]。また、温和な加水分解条件では KDO を遊離せず、従って、Weiss-bach の方法[37]によっては KDO が検出されないコレラ菌 LPS においても弱酸処理により DPS とリピド A に分解されることが明らかにされている [18]。O1 コレラ菌 LPS から調製した DPS は、Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーにより、3 つの画分に分画されるが、LPS の多糖体画分 (Frc. II) は、サルモネラや大腸菌等の Frc. I と異なり、void volume よりやや遅れて溶出される。また、Frc. IV には、KDO は含まれず、その代りに遊離のフルクトースが分画される(Fig. 10 B)。



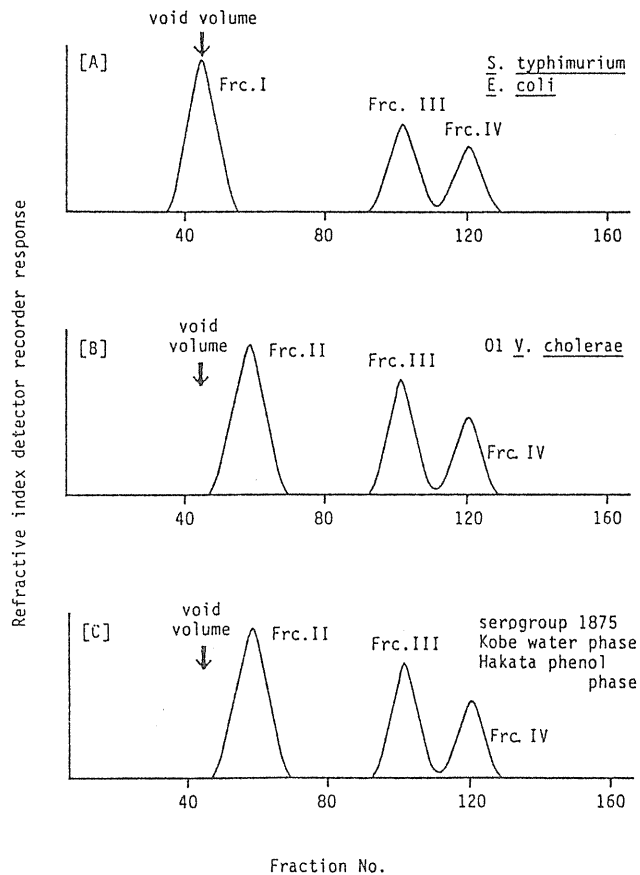


Fig. 10. Sephadex G-50 gel-chromatography of degraded polysaccharide (DPS) fraction from gram-negative bacterial LPS.

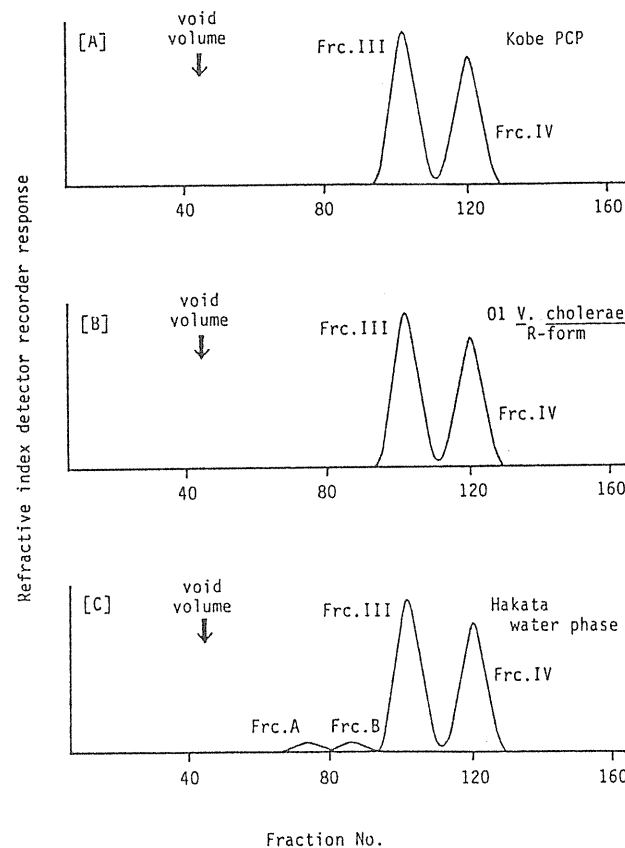


Fig. 11. Sephadex G-50 gel-chromatography of degraded polysaccharide (DPS) fraction from gram-negative bacterial LPS.

Fig.10 C に示したように、*Vibrio* bio-serogroup 1875 Original LPS と Variant LPS, *V. fluvialis* 181-86 Kobe W-LPS および *V. cholerae* bio-serogroup Hakata P-LPS から調製した DPS は、Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーにより、O1 コレラ菌 DPS の場合と同様に、Frc. II, Frc. III および Frc. IV の 3 つの画分に分画された。これらの各画分の溶出位置も O1 コレラ菌 DPS 画分のそれとほぼ一致しており、これらの LPS は S 型 LPS であることが明らかになった。一方、*V. fluvialis* 181-86 PCP-LPS から調製した DPS は、同ゲルクロマトグラフィーにおいて、Frc. III と Frc. IV の 2 つの画分のみに分画され、コアが結合した O-抗原特異多糖側鎖画分に相当する Frc. II は得られなかった (Fig. 11 A)。この溶出パターンは、むしろ、O-抗原特異多糖側鎖を欠損した R 型 コレラ菌 DPS (Fig. 11 B) のそれ [18] と類似しており、Kobe PCP-LPS は、O-抗原特異多糖側鎖を欠く R 型の LPS であることが示された。また、*V. cholerae* bio-sero-group Hakata W-LPS の DPS から Frc. II は得られなかった。しかし、Hakata W-LPS 由来の DPS からは、Frc. III, Frc. IV の 2 つの主要な画分の他に、O1 コレラ菌の Frc. II よりやや遅れた位置に 2 つの小さな画分 (それぞれ Frc. A, Frc. B と仮称する) が得られた (Fig. 11 C)。

#### 4-2. DPS 画分の糖組成

各 LPS から調製した DPS の Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーによって得られた上記の各 Frc. の糖組成を Table 3 に示した。分析値は、Kobe 株以外の菌株では L-グリセロ-D-マンノヘプトースの含量を 3 モル、また、Kobe 株の場合では L-グリセロ-D-マンノヘプトースと D-グリセロ-D-マンノヘプトースの総含量を 3 モルとした際の各構成糖のモル比で表した。前述のように、Frc. II (Fig. 10) はコアが結合した O-抗原特異多糖側鎖画分、Frc. III (Fig. 10) はコア画分に相当し、また、Frc. IV (Fig. 10) は単糖画分に相当する。従って、一般的には、Frc. II の糖組成から Frc. III のそれを除いた糖組成から、その LPS の O-

Table 3. Sugar composition of DPS fractions isolated from *V. cholerae*, *Vibrio* bio-serogroup 1875 and *V. fluvialis* 181-86 Kobe (molar ratio)

		Glc	Gal	Man	Fru	NS <sup>a)</sup>		Hep	GlcN	GalN	QuiN	PerN	AS <sup>b)</sup>	Uronic acid
						I	II							
Frc. II	P1418 (Ogawa)	0.9	- <sup>d)</sup>	-	-	-	-	3.0	-	-	1.7	18.0	-	-
	P1418-UV601 (Inaba)	0.7	-	-	-	-	- <sup>e)</sup>	3.0	-	-	1.7	18.0	-	-
	1875 Original	1.2	-	0.7	-	+	+	3.0	1.0	-	1.3	3.2	-	-
	1875 Variant	1.2	-	0.7	-	+	+	3.0	1.0	-	1.3	3.2	-	-
	Kobe water phase	2.8	-	0.7	-	+	+	3.0	0.1	0.1	1.2	2.1	-	3.4
	Hakata phenol phase	2.5	1.3	0.5	-	-	-	3.0	0.3	-	1.2	0.5	7.1	-
Frc. III	P1418 (Ogawa)	0.9	-	-	-	-	-	3.0	0.1	-	-	-	-	-
	P1418-UV601 (Inaba)	0.9	-	-	-	-	-	3.0	0.1	-	-	-	-	-
	1875 Original	1.2	-	-	-	-	-	3.0	1.2	-	-	-	-	-
	1875 Variant	1.2	-	-	-	-	-	3.0	1.2	-	-	-	-	- <sup>g)</sup>
	Kobe water phase	1.8	-	-	-	-	-	3.0	0.1	0.1	-	-	-	3.2
	Kobe PCP	1.7	-	-	-	-	-	3.0	tr <sup>c)</sup>	tr	-	-	-	3.5
Frc. IV <sup>f)</sup>	Hakata phenol phase	2.5	1.1	-	-	-	-	3.0	0.3	-	-	-	-	-
	Hakata water phase	2.7	1.2	-	-	-	-	3.0	0.2	-	-	-	-	-
	P1418 (Ogawa)	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P1418-UV601 (Inaba)	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1875 Original	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1875 Variant	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Kobe water phase	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++ <sup>h)</sup>
	Kobe PCP	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
	Hakata phenol phase	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hakata water phase	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<hr/>														
Frc. A	Hakata water phase	2.7	1.4	0.6	-	-	-	3.0	0.2	0.7	0.9	0.2	3.4	-
Frc. B	Hakata water phase	2.5	1.3	0.1	-	-	-	3.0	0.3	0.9	0.7	-	-	-

The data represent the molar ratios of the component sugars found in each fraction, the values being calculated on the basis of the assumption that each fraction contains 3 moles of heptose. Abbreviations: Glc, glucose; Gal, galactose; Man, mannose; Fru, fructose; Hep, L-glycero-D-manno-heptose with the exception of Kobe W- and PCP-DPS. In the case of Kobe W- and PCP-DPS, L-glycero-D-manno-heptose + D-glycero-D-manno-heptose; GlcN, glucosamine; GalN, galactosamine; QuiN, quinovosamine; PerN, perosamine. a) NS, unknown neutral sugars. b) AS, unknown amino sugar. c) tr, trace amount, less than 0.1 mole/3 mole of heptose. d) -, not detected or less than 0.01 mole/3 moles of heptose in Frc. II and III, and 0.1% (w/w) in Frc. IV. e) NS I contents in Frc. II of 1875 Original-, 1875 Variant- and Kobe W-DPS were 5.8%, 5.6% and 3.2%, respectively. NS II contents of Frc. II of 1875 Original-, 1875 Variant- and Kobe W-DPS were 14.9%, 14.2% and 13.6%, respectively. f) Fructose contents in Frc. IV of P1418-, P1418-UV601-, 1875 Original-, 1875 Variant-, Hakata P- and Hakata W-DPS were 25.7%, 24.6%, 44.0%, 42.0%, 24.4% and 34.3%, respectively. Galactose contents in Frc. IV of Kobe W- and Kobe PCP-DPS were 4.2% and 1.2%, respectively. Uronic acid contents in Frc. IV of Kobe W- and Kobe PCP-DPS were 19.4% and 6.3%, respectively. g) glucuronic acid. h) galacturonic acid. AS and all neutral sugars except fructose were determined by gas-liquid chromatography (GLC) using program 1 (Table E-5 shown in experimental part) as alditol acetate derivatives after acid hydrolysis in 2 M-trifluoroic acid at 120°C for 1 hr. Fructose was determined by GLC using program 1 as O-acetyl-O-methylxime derivative after weak-acid hydrolysis in 5% acetic acid at 100°C for 2 hr. All amino sugars except perosamine were determined by GLC using program 2 (Table E-5) as N-acetyl-alditol acetate derivatives after acid hydrolysis in 4 M-HCl at 100°C for 8 hr. Perosamine was determined by GLC using program 2 as N-acetyl-alditol acetate derivative after acid hydrolysis in 10 M-HCl at 90°C for 15 min. Heptose was also estimated by colorimetric analysis according to method of Osborn [32]. Uronic acid was estimated by method of Bitter & Muir [38].

抗原特異多糖側鎖を構成する糖成分を知ることが出来る。

Table 3 に示したように、1875 Original と Variant の各 DPS 画分は、ほぼ同一の組成を持っていた。Frc. III は、構成糖としてグルコース、L-グリセロ-D-マンノヘプトース、グルコサミンを 1.2:3.0:1.2 のモル比で含んでいた。また、Frc. II は、Frc. III の糖成分に加えるに、モル比 0.7:3.2:1.3 のマンノース、ペロサミンおよびキノボサミン、さらに 2 つの未同定物質(NS I, NS II)を含んでいた。Frc. II における NS I および NS II の含量は、Original の場合それぞれ 5.8% と 14.9%, Variant では 5.6%, 14.2% であった。従って、Frc. II と Frc. III に含まれる糖成分の分布パターンから、1875 Original LPS と Variant LPS のコア部分は、約 1:3:1 のグルコース、L-グリセロ-D-マンノヘプトースおよびグルコサミンから構成されていることが明らかになった。また、両 LPS の O-抗原特異多糖側鎖部分は、L-グリセロ-D-マンノヘプトース 3 モルに対し、約 1:3:1 モルのマンノース、ペロサミンおよびキノボサミン、さらに NS I, NS II から構成されていることが明らかになった。

Table 3 に示したように、Kobe PCP-LPS と Kobe W-LPS 由来 DPS の Frc. III は、構成糖としてグルコース、L-グリセロ-D-マンノヘプトース、D-グリセロ-D-マンノヘプトース、ウロン酸と少量のグルコサミン、ガラクトサミンを含んでいた。Frc. III を 4M 塩酸で加水分解 (100°C, 45 分)した後、高圧濾紙電気泳動によりウロン酸の検出を行った結果、本画分に含まれるウロン酸は標準のグルクロン酸と同一の移動度を示し、そのガラクトン酸に対する相対移動度は 1.18 であった。また、本画分における L-グリセロ-D-マンノヘプトースと D-グリセロ-D-マンノヘプトースの存在比は、GLC 分析により検討した結果、1:2 であった。従って、Kobe PCP-LPS と Kobe W-LPS のコア部分は、主に、約 2:1:2:3 のグルコース、L-グリセロ-D-マンノヘプトース、D-グリセロ-D-マンノヘプトースおよびグルクロン酸と少量のグルコサミンとガラクトサミンから構成されていることが明らかになった。また、Kobe W-LPS 由来 DPS の Frc. II と Frc. III の糖組成(Table 3)の比較から、Kobe W-LPS の O-抗原特異多糖側鎖は、ヘプトース 3 モルに対し、約 1:1:2:1 モルのグルコ-

ス、マンノース、ペロサミンおよびキノボサミン、さらに NS I, NS II から構成されていることが明らかになった。Frc. II における NS I と NS II の含量は、それぞれ 3.2%, 13.6% であった。

同様に、Hakata P-LPS および Hakata W-LPS 由来 DPS の Frc. III の糖組成 (Table 3) から、両 LPS のコア部分は、ともに、モル比 約 3:1:3 のグルコース、ガラクトースおよび L-グリセロ-D-マンノヘプトース、さらに少量のグルコサミンから構成されていることが明らかになった。また、Hakata P-LPS 由来 DPS の Frc. II と Frc. III の糖組成 (Table 3) の比較から、Hakata P-LPS の O-抗原特異多糖側鎖は、L-グリセロ-D-マンノヘプトース 3 モルに対し、およそ 0.5:0.5:1:7 モルのマンノース、ペロサミン、キノボサミンおよび未同定アミノ糖 (AS) から構成されていることが明らかになった。

Table 3 に示したように、1875 Original LPS, Variant LPS, Hakata P-LPS および Hakata W-LPS 由来 DPS の各 Frc. IV からは、酢酸加熱により遊離したフルクトースが検出されたが、本 Frc. における他の糖成分の含量は 0.1% 未満であった。各菌株由来の Frc. IV におけるフルクトースの含量は、それぞれ 44.0%, 42.0%, 24.4% および 34.3% であった。また、Kobe PCP-LPS と Kobe W-LPS 由来 DPS の Frc. IV は、遊離のウロン酸 (6.3%, 19.4%) と少量のガラクトース (1.4%, 4.2%) を含んでいた。このウロン酸は、高圧濾紙電気泳動において、標準のガラクトウロン酸と同一の移動度を示す単一スポットを与えたことから、本 Frc. に存在するウロン酸はガラクトウロン酸と同定した。

Hakata W-LPS 由来 DPS から 3.6% 得られた Frc. A (Fig. 11 C) は、マンノース、ペロサミン、キノボサミン および AS を L-グリセロ-D-マンノヘプトース 3 モルに対し 0.6:0.2:0.9:3.4 のモル比で含み、ガラクトサミンを含むことと AS 含量が低いことを除けば、Hakata P-LPS 由来 DPS の Frc. II と類似した糖組成を持っていた (Table 3)。また、同 DPS から得られた Frc. B (Fig. 11 C) は、Frc. A と比較すると、マンノース含量が低く、ペロサミン と AS を欠損していた。従って、Hakata W-LPS の大部分は O-抗原特異多糖側鎖を欠いた R 型の LPS であるが、

ごく一部の LPS 分子 (Frc. A の収量から考えて約 3%) は、ペロサミン、キノボサミン、マンノースおよび AS から成る O-抗原特異多糖側鎖を持つことが明らかになった。また、前述の如く、Frc. B は Frc. A と比較するとマンノース含量が低く、かつ、ペロサミンと AS を欠損していたことから、これら 3 種の糖成分はキノボサミンとガラクトサミンよりコアから離れた部分に存在することが明らかになった。

O1 コレラ菌 P1418 (Ogawa) と P1418 UV-601 (Inaba) の DPS から得られた Frc. II と Frc. III における糖成分の分布パターン (Table 3) から、両 LPS の O-抗原特異多糖側鎖は、L-グリセロ-D-マンノヘプトース 3 モルに対し、18:2 モルのペロサミンとキノボサミンにより構成されていることが分る。本実験により、この 2 つの糖成分は、1875 Original LPS, 1875 Varinat LPS, Kobe W-LPS および Hakata P-LPS の O-抗原特異多糖側鎖にも存在することが明らかになった。ペロサミンとキノボサミンは、Inaba 因子 C のみを持つ 1875 Variant, Kobe および Hakata 株の LPS にも少量ながら見出されることは、少なくとも C 因子にこの 2 つの糖質が抗原的に関連あることを示しているものと思われる。また、1875 Original LPS, 1875 Variant LPS, Kobe W-LPS に見出された NS I, NS II, Hakata P-LPS に含まれていた AS、およびこれらの各 LPS に共通に含まれていたマンノースは、ともに、各 LPS の O-抗原特異多糖側鎖部位に存在することが明らかになった。O1 コレラ菌 LPS のコア部分は、主に、モル比 1:3 のグルコースと L-グリセロ-D-マンノヘプトースから構成されている。1875 株, Kobe 株 および Hakata 株 LPS のコアは、O1 コレラ菌 LPS のコア部分を構成する糖成分の他に、それぞれ、グルコサミン、D-グリセロ-D-マンノヘプトースとグルクロン酸、およびガラクトースを含んでおり、O1 コレラ菌 LPS のコアとは異なる構造を持つことが明らかになった。1875 株と Hakata 株の Frc. IV からは、O1 コレラ菌 LPS の常成分であるフルクトースが検出されたが、C 因子を持つ Kobe 株の LPS はフルクトースを含んでいなかった。従って、フルクトースは、コレラ菌の血清学的 O1 特異性には関与していないことが推測された。また、これを支持する別の成績も、久恒ら[55]により報告さ

れている。

## 第 5 節. LPS の ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

LPS は、KDO およびウロン酸などカルボキシル基を持つ酸性糖やリン酸を含んでいるので、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) において、陰極から陽極へ泳動する。電気泳動後のポリアクリルアミドゲルからの LPS 成分の検出法としては、従来、過ヨウ素酸・シッフ染色法 [71] が用いられていたが、本染色法は検出感度に関して若干の問題があった [70]。しかし、近年、Tsai と Frasch [70] により、過ヨウ素酸・シッフ染色法の約 500 倍の感度を持つ銀染色法が開発され、現在、SDS-PAGE は、LPS の分子構築を検討するための重要な実験法となっている。本実験では、SDS-PAGE を行うことにより、各 LPS の分子構築を検討した。

O1 コレラ菌, 1875 株, Kobe 株 および Hakata 株の各 LPS の SDS-PAGE の結果を Fig. 12 に示した。対照には、S 型 LPS として Salmonella typhimurium LT2 LPS、また、R 型 LPS として Salmonella minnesota R595 LPS を用いた。Fig. 12 では、上部が陰極、下部が陽極であり、下へ行くに従って分子量が小さくなる。

Fig. 12 lane A に示したように、S. typhimurium LT2 等の一般グラム陰性細菌の LPS は、LPS O-抗原特異多糖側鎖部分の繰返し単位 (repeating unit, Fig. 2) の数の相違等に基づく多くの heterogeneity が存在するため、同一株から分離した LPS においても極端な多様性を示すのが通常であり、SDS-PAGE において、これらの LPS からは階段状の多数のバンドが観察される [72]。また、Fig. 12 lane J に示したように、LPS 多糖体部分を欠損し、リビド A に 3 分子の KDO が結合した簡単な構造を持つ S. minnesota R595 LPS [73] では、上記のような heterogeneity は認められず、SDS-PAGE において、同 LPS は低分子量側に単一バンドとして泳動される [74]。

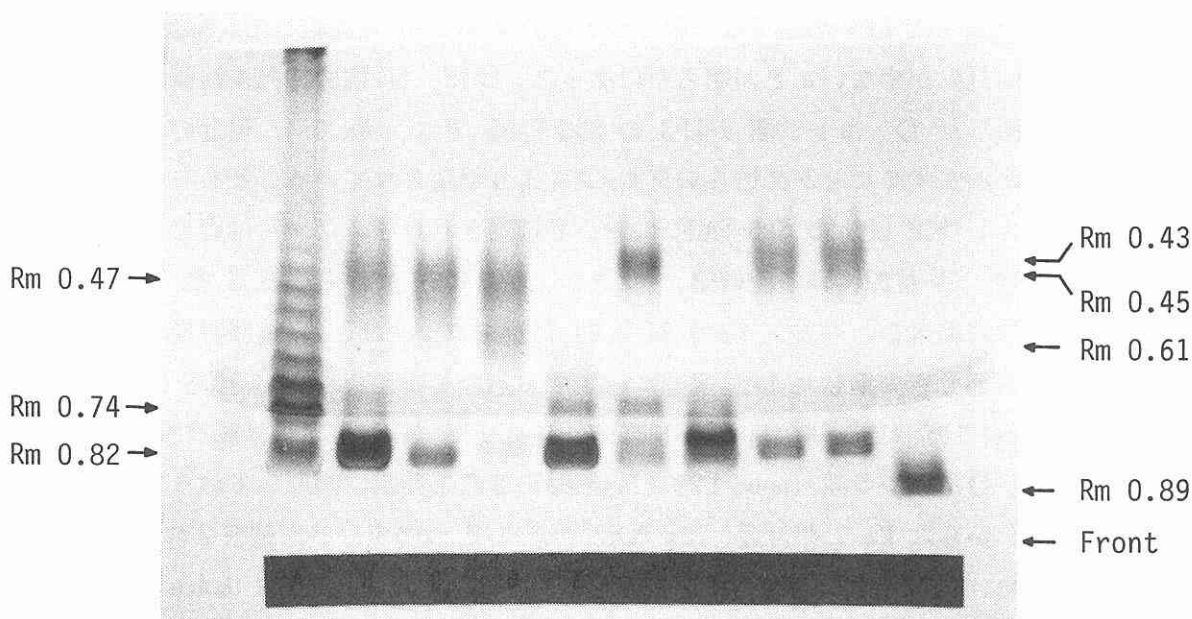


Fig. 12. SDS-PAGE analysis of LPS isolated from each strain. Samples of 2  $\mu$ g were analyzed on SDS-PAGE except as noted. Lane A, *S. typhimurium* LT2 LPS; lane B, O1 *V. cholerae* NIH 41 (Ogawa) LPS; lane C, O1 *V. cholerae* 569B (Inaba) LPS; lane D, Hakata P-LPS; lane E, Hakata W-LPS; lane F, Kobe W-LPS; lane G, Kobe PCP-LPS; lane H, 1875 Original LPS; lane I, 1875 Variant LPS; lane J, *S. minnesota* R595 LPS, 4  $\mu$ g. Detection of LPS is performed by silver stain.

Fig. 12 lane B に O1 コレラ菌 NIH 41(Ogawa) LPS, lane C に O1 コレラ菌 569B(Inaba) LPS の SDS-PAGE における泳動パターンを示した。O1 コレラ菌 LPS では、フロントマーカーに対する相対移動度(Rm) 0.47 付近にブロードなバンドが観察されたほか、Rm 0.82 付近、また、Ogawa の場合 Rm 0.74 付近にそれぞれバンドが観察されたのみであり、*S. typhimurium* LT2 LPS の SDS-PAGE (lane A) において観察された階段状の



バンドは認められなかった。すなわち、O1 コレラ菌 LPS は、*S. typhimurium* LT2 LPS のような一般グラム陰性細菌 LPS と比較して、heterogeneity が少ないことが明らかになった。また、O-抗原特異多糖側鎖を欠損した O1 コレラ菌 R-LPS の SDS-PAGE では、 $R_m$  0.47 付近のバンドが消失することが久恒らのグループにより確認されていることから、O1 コレラ菌 LPS の SDS-PAGE において観察された  $R_m$  0.47 付近のバンドは、O-抗原特異多糖側鎖、コアおよびリピド A から成る S 型 LPS 成分に相当し、一方、 $R_m$  0.74~0.82 付近のバンドは、O-抗原特異多糖側鎖部分を欠損した LPS 成分に由来するものと考えられる。1875 Original LPS (lane H) および 1875 Variant LPS (lane I) の泳動パターンは、O1 コレラ菌 Inaba LPS (lane C) のそれと非常に類似しており、両 LPS からは  $R_m$  0.43 付近と  $R_m$  0.82 付近に 2 つのバンドが観察された。また、Kobe W-LPS (lane F) の泳動パターンは、O1 コレラ菌 Ogawa LPS (lane B) に類似しており、本 LPS は SDS-PAGE に  $R_m$  0.45,  $R_m$  0.74 および  $R_m$  0.82 付近に泳動される 3 つの成分に分離された。Hakata P-LPS (lane D) からは、O1 コレラ菌 (lane B, C), 1875 株 LPS (lane H, I) および Kobe W-LPS (lane F) の場合と同様、 $R_m$  0.47 と  $R_m$  0.82 付近にそれぞれバンドが観察された他に、 $R_m$  0.55~0.66 にかけてもブロードなバンドが検出された。一方、Hakata W-LPS (lane E) と Kobe PCP-LPS (lane G) からは、 $R_m$  0.74 と  $R_m$  0.82 付近の 2 つのバンドは検出されたが、他の各 LPS に観察された  $R_m$  0.43~0.47 付近のバンドが検出できなかった。

第 4 節で明らかにしたように、Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーにおいて、O1 コレラ菌、1875 株、Kobe W- および Hakata P-LPS から調製した DPS からは、コアが結合した O-抗原特異多糖側鎖画分 (Frc. II) とコア画分 (Frc. III) が得られるが、Kobe PCP-LPS および Hakata W-LPS 由来の DPS からは、Frc. II は得られない (Fig. 10, 11)。本 SDS-PAGE においても上記と同様な結果が得られ、O-抗原特異多糖側鎖を持つ LPS に相当する  $R_m$  0.43~0.47 付近のバンドは、O1 コレラ菌 LPS (lane B, C), 1875 株 LPS (lane H, I), Kobe W-LPS (lane F) および

Hakata P-LPS (lane D)では観察されたが、HakataW-LPS (lane E)および Kobe PCP-LPS (lane G)からは検出できなかった。すなわち、SDS-PAGEにおいても、Hakata W-LPS と Kobe PCP-LPS は O-抗原特異多糖側鎖を欠損した R型 LPSであることが示された。

#### 第 6 節. LPS 多糖体部分の糖組成に基づく *V. cholerae* bio-serogroup Hakata の化学分類

前述の如く、現在、LPS の調製法としては Westphal のフェノール・水法[21] および Galanos の PCP 法 [20]が最も広範に用いられている。しかし、これらの方法による LPSの調製には、超遠心分離の反復など多大の時間を要するため、多くの野外分離株や患者分離株から LPS を短時間に調製するのは非常に困難である。近年、久恒ら[56,57]は、LPS を抽出することなく、菌体から直接 LPS 多糖部を短時間に分離する方法(迅速簡便法)を開発した。また、久恒らは、LPS 多糖部の糖組成に基礎を置く化学分類の立場から、本法をビブリオ科細菌をはじめサルモネラ、大腸菌および野外分離株や患者分離株など多くのグラム陰性細菌に適用し、細菌の同定や分類に関する本法の有用性を確認している [56,57]。

*V. cholerae* bio-serogroup Hakata は、Fig. 1 に示したように、O1 コレラ菌の 3 つの O-抗原因子 (A・B・C)のうち Inaba 因子 C を持っている。従って、本菌は、主要抗原因子 A を欠くにも拘らず、市販のコレラ菌血清と Inaba 因子血清に凝集し、血清学的に Inaba 型 O1 コレラ菌として誤って診断され得る可能性などがあるため、衛生行政上大きな問題を提起している。本実験では、これらの諸問題解決の糸口として、迅速簡便法を用いて、我国において分離された 31 株の本菌の LPS 多糖部の糖組成を検討し、それに基づく化学分類を行うとともに、本菌と O1 コレラ菌との判別を試みた。

用いた *V. cholerae* bio-serogroup Hakata 31 株のうち、22 株は環境由来株であり、残りの 9 株は、フィリピン、バングラディッシュ、インド、ベトナム等から輸入された食品由来株である。これらの株は、過

Table 4. Sugar composition of the polysaccharide portion of *V. cholerae* bio-serogroup Hakata LPS isolated by simple rapid method ( $\mu\text{g/g}$  wet cell)

		Glc	Gal	Man	Fru	Hep	GlcN	GalN	PerN	QuiN	AS <sup>a)</sup>
Isolated from environment											
NQ-1	(estuarine water)	282.6	—	47.7	334.8	210.8	21.6	—	29.4	61.8	402.4
NQ-2	( " )	249.1	—	47.7	316.8	173.2	25.0	—	28.8	68.2	343.3
NQ-3	( " )	362.1	—	38.1	211.0	242.2	31.2	—	13.9	47.6	663.0
NQ-4	( " )	256.9	—	39.9	212.5	239.2	42.6	—	23.0	82.0	633.5
NQ-5	( " )	197.0	—	30.6	238.0	174.1	25.4	—	27.0	57.8	328.8
NQ-6	( " )	261.9	—	32.8	230.0	177.9	22.2	—	26.2	54.2	340.7
NQ-7	( " )	209.6	—	36.9	268.0	189.2	27.7	—	31.2	66.6	455.7
NQ-8	( " )	251.1	—	42.5	258.8	220.6	33.9	—	33.7	78.9	455.8
NQ-9	( " )	339.7	—	30.4	261.1	214.5	24.8	—	19.5	57.5	522.6
NQ-10	( " )	297.7	—	41.7	231.6	250.2	22.2	—	30.2	95.1	588.0
NQ-11	( " )	342.4	—	39.4	265.9	262.9	18.2	—	21.1	68.2	674.0
NQ-12	( " )	442.7	—	46.4	274.2	249.6	31.6	—	30.4	93.6	569.4
NQ-13	( " )	245.0	—	34.3	256.8	190.4	23.5	—	32.4	59.4	379.1
NQ-14	( " )	235.9	—	39.2	264.0	211.3	26.5	—	32.8	64.5	408.2
NQ-15	( " )	251.8	—	42.7	277.6	214.0	33.6	—	37.5	82.5	473.4
NQ-16	( " )	223.7	—	35.7	264.4	181.4	28.4	—	33.1	69.9	476.3
NAHA-1	(river water)	274.6	—	46.5	286.0	241.9	28.9	—	36.6	83.1	559.0
683-85	( " )	276.4	—	41.7	243.2	196.5	21.1	—	24.5	64.3	369.4
F-C1	(sea water)	222.2	—	35.5	202.4	181.2	25.4	—	34.0	63.0	400.3
OQ-C1	(sea water)	323.1	152.8	46.9	272.0	215.5	33.8	8.2	37.5	79.6	470.2
OQ-C3	( " )	330.0	155.5	47.7	212.8	204.0	51.9	7.8	42.7	102.5	466.6
487-85	( " )	377.9	177.8	47.5	234.0	218.4	39.9	9.3	35.7	81.3	453.2

a) AS, unknown amino sugar. Abbreviations: Glc, glucose; Gal, galactose; Man, mannose; Fru, fructose; Hep, L-glycero-D-manno-heptose; GlcN, glucosamine; GalN, galactosamine; PerN, perosamine; QuiN, quinovosamine. NQ-1 to NQ-16 strains were isolated by Nagoya Quarantine Office. NAHA-1 strain was isolated by NAHA Quarantine Office. 683-85, F-C1 and 487-85 strains were isolated by Fukuoka Quarantine Office. OQ-C1 and OQ-C3 strains were isolated by Osaka Quarantine Office. All neutral sugars except fructose were determined by gas-liquid chromatography (GLC) using program 1 (Table E-5) as alditol acetate derivatives, as shown in experimental part. Fructose was determined by GLC using program 1 as O-acetyl-O-methyl-oxime derivative. All amino sugars were determined by GLC using program 2 as N-acetyl-alditol acetate derivatives.

Table 5. Sugar composition of the polysaccharide portion of V. cholerae bio-serogroup Hakata LPS isolated by simple rapid method ( $\mu\text{g/g}$  wet cell)

	Glc	Gal	Man	Fru	Hep	GlcN	GalN	PerN	QuiN	AS <sup>a)</sup>
Isolated from imported foods										
772-82 ( Shrimp )	228.6	—	39.9	268.0	174.6	25.2	—	29.4	72.4	309.1
TQ-C1 ( " )	199.2	—	33.0	248.8	192.1	25.6	—	25.1	55.4	317.1
TQ-C2 (cuttlefish)	197.8	—	31.7	201.6	171.7	18.6	—	25.7	46.7	431.6
TQ-C3 ( " )	346.1	—	45.1	181.7	242.5	16.3	—	17.9	70.9	682.6
TQ-C4 ( " )	328.0	—	43.8	159.6	242.0	31.4	—	18.0	73.6	627.8
TQ-C5 ( " )	204.0	—	28.6	193.6	202.3	18.7	—	37.6	56.5	423.1
KQ-C1 ( " )	137.8	—	21.5	171.0	142.1	20.7	—	24.5	60.3	237.2
KQ-C2 ( " )	236.8	—	30.9	218.0	169.6	24.6	—	26.3	63.3	352.4
OQ-C2 ( " )	205.5	—	37.6	172.8	199.5	12.1	—	21.4	42.2	429.1

a) AS, unknown amino sugar. Abbreviations: Glc, glucose; Gal, galactose; Man, mannose; Fru, fructose; Hep, L-glycero-D-manno-heptose; GlcN, glucosamine; GalN, galactosamine; PerN, perosamine; QuiN, quinovosamine. TQ-C1, C2, C3, C4 and C5 strains were isolated by Tokyo Quarantine Office. KQ-C1 and KQ-C2 strains were isolated by Kobe Quarantine Office. OQ-C2 strain was isolated by Osaka Quarantine Office. 772-82 strain was isolated by Fukuoka Quarantine Office. All neutral sugars except fructose were determined by gas-liquid chromatography (GLC) using program 1 (Table E-5) as alditol acetate derivatives, as shown in experimental part. Fructose was determined by GLC using program 1 as O-acetyl-O-methylloxime derivative. All amino sugars were determined by GLC using program 2 as N-acetyl-alditol acetate derivatives.

Table 6. Sugar composition of the polysaccharide portion of 01 V. cholerae LPS isolated by simple rapid method (ug/g wet cell).

	Glc	Gal	Man	Fru	Hep	GlcN	GalN	PerN	QuiN	AS <sup>a)</sup>
01 <u>V. cholerae</u> NIH 41 (Ogawa)	231.0	—	—	164.0	153.0	48.0	—	231.9	118.5	—
01 <u>V. cholerae</u> 569B (Inaba)	224.5	—	—	158.2	150.4	47.5	—	219.6	115.2	—

a) AS, unknown amino sugar found in Hakata P-LPS. Abbreviations: Glc, glucos; Gal, galactose; Man, mannose; Fru, fructose; Hep, L-glycero-D-manno-heptose; GlcN, glucosamine; GalN, galactosamine; PerN, perosamine; QuiN, quinosamine. All neutral sugars except fructose were determined by gas-liquid chromatography (GLC) using program 1 (Table E-5) as alditol-acetate derivatives, as shown in experimental part. Fructose was determined by GLC using program 1 as O-acetyl-O-methyloxime derivative. All amino sugars were determined by GLC using program 2 as N-acetyl-alditol acetate derivatives.

去 8 年間、異なった場所で分離され、O1 コレラ菌 O-抗原因子 A・B・C の各々に対する単クローン抗体および島田ら[9]により調製された Hakata に対する因子血清 (F 因子血清)を使用することにより Hakata 株であることが確認された。Table 4 と Table 5 に、迅速簡便法により菌体から直接分離した上記菌体由来の LPS 多糖部の糖組成を示した。分析値は、湿菌 1g に対する各糖成分の重量を  $\mu\text{g}$  で表した。環境由来の 19 株と食品由来全株の LPS 多糖部の糖組成は、定性的に同一であり、全ての菌株からグルコース、マンノース、フルクトース、L-グリセロ-D-マンノヘプトース、グルコサミン、ペロサミン、キノボサミンおよび未同定アミノ糖 (AS)が検出された。また、環境由来株のうち、大阪検疫所により分離された OQ-C1, OQ-C3 および福岡衛生試験所により分離された 487-85 の 3 株は、上述の糖成分の他に、ガラクトースと少量のガラクトサミンを含んでいた。

本実験により、これらの Hakata 株は、LPS 多糖部の糖組成の上で極めて homogeneous であることが明らかになった。V. cholerae bio-serogroup Hakata は、O-抗原である LPS 多糖部の糖組成に基礎を置く化学分類法において、ガラクトースとガラクトサミンを含まない第 1 グループと、両糖成分を含む第 2 グループの 2 つの化学型に分類できた。また、第 1 グループと第 2 グループを問わず、本実験に供した全ての Hakata 株は、O1 コレラ菌 LPS の常成分であるペロサミン、キノボサミンおよびフルクトースを含み、本化学分類上、O1 コレラ菌に類似することが示された (Table 4, 5, 6)。しかし、これらの糖質のほかに、全ての Hakata 株から、マンノースと AS が検出され、この点で本菌株は O1 コレラ菌と完全に区別できることが明らかになった。

#### 第 7 節. Hakata LPS に見出された未同定アミノ糖の構造確認と Hakata LPS O-抗原特異多糖側鎖の構造解析

V. cholerae bio-serogroup Hakata P-LPS に見出された未同定アミノ糖 (AS) の構造確認を行った。AS の GLC および 薄層クロマトグラフィー

Table 7. Chromatographic behaviors of unknown amino sugar (AS) present in V. cholerae bio-serogroup Hakata LPS

	GLC <sup>a)</sup>			TLC <sup>b)</sup>
	A	B	C	
Standard materials				
Xylose	1.00	1.00		
Mannose			1.00	
Glucosamine				1.00
Perosamine from O1 <u>V. cholerae</u>	1.38	1.85	1.07	1.34
Unknown amino sugar (AS) from Hakata LPS	1.38	1.85	1.07	nd <sup>c)</sup>

a) GLC, gas-liquid chromatography : retention time values of alditol acetate derivatives relative to that of each standard material using (A) ULBON HA-54 capillary column (0.24 mm x 25 m, 150-230°C, 2°C/min), (B) 3% ECNSS-M column (3 mm x 2 m, 150-190°C, 2°C/min) and (C) TABSORB column (3 mm x 2 m, 160-210°C, 2°C/min). b) TLC, thin layer chromatography on avicel plate with the solvent system, butanol/pyridine/water/acetic acid (6:4:3:1, by vol.) c) nd, not detected by ninhydrine reagent.

(TLC)における諸性状を Table 7 に示した。AS は、当初、酸加水分解 (10M 塩酸・90°C・15 分あるいは 2M トリフルオロ酢酸・120°C・1 時間)後の Dowex 50 (H<sup>+</sup>) イオン交換クロマトグラフィーにより中性糖画分に分画され、また、TLC においてニンヒドリン試薬で発色しなかったことなどから、中性糖であると思われた。しかし、AS の全アセチル誘導体は、種々のカラムを用いた GLC 分析において、O1 コレラ菌 LPS から分離したペロサミンのそれと、全く同一の相対保持時間を示した。

Fig. 13 と Fig. 14 に、誘導体化の際、重水素化ホウ素ナトリウムを用いて還元することにより、1 位を重水素標識した AS の完全アセチル ([1-<sup>2</sup>H]標識)誘導体の GC/MS 分析における開裂パターンを示した。AS の完全アセチル ([1-<sup>2</sup>H]標識)誘導体の EI-MS 分析における開裂パターンは、

O1 コレラ菌 LPS 由来のペロサミンのそれとほぼ同一であり、4-アミノ糖であることを示す  $m/e$  289 とこれから誘導される  $m/e$  247, 229, 187, 169, 127 のイオンフラグメント、また、4-アミノ-4,6-ジデオキシ糖であることを示す  $m/e$  230, 158 とこれらから誘導される  $m/e$  170, 128 および  $m/e$  116, 98 などの各イオンフラグメントが観察された (Fig.13)。

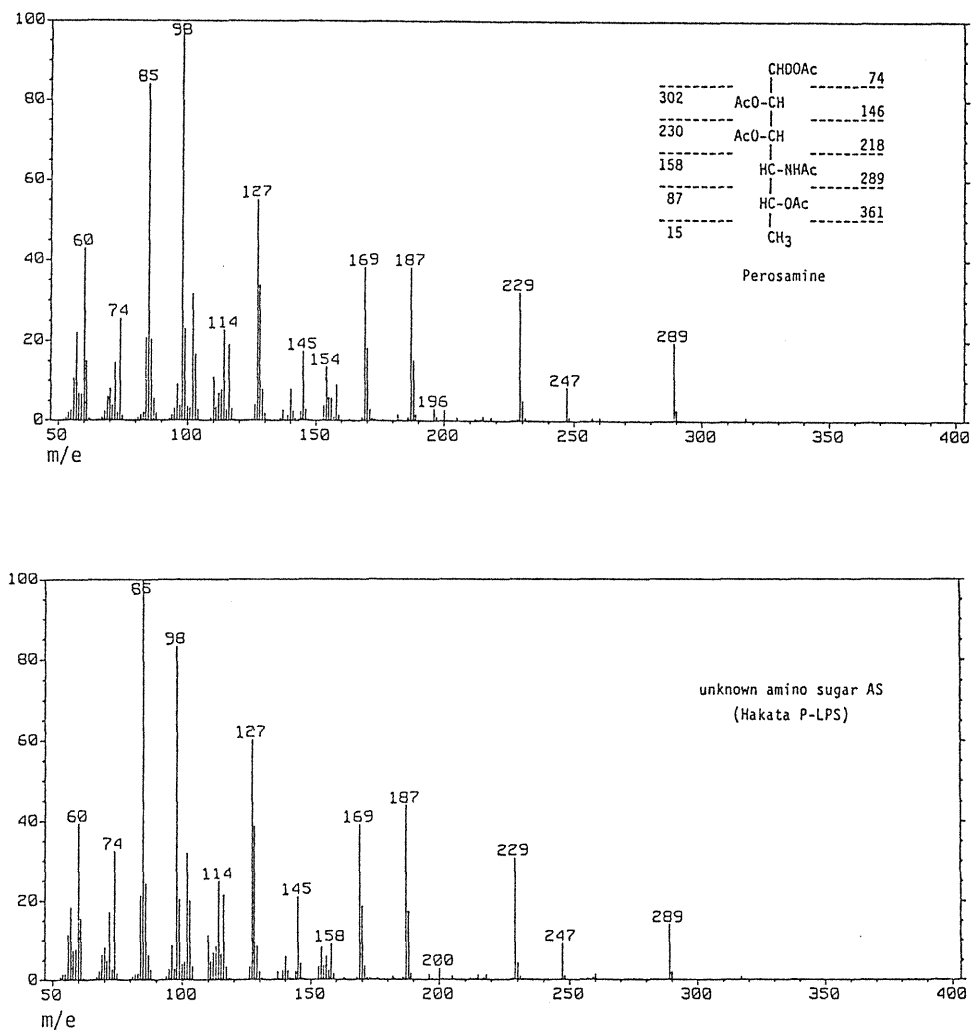


Fig. 13. Mass spectra of peracetylated derivatives of perosamine from O1 *V. cholerae* LPS and unknown amino sugar (AS) from *V. cholerae* bio-serogroup Hakata LPS in EI-MS. The condition on GC/MS analysis; program 4 in Table E-5 shown in experimental part.



また、CI-MS 分析においても、ペロサミンと同様のスペクトルを示し、4-アミノ-4,6-ジデオキシヘキソースの完全アセチル([1-<sup>2</sup>H] 標識)誘導体の分子イオン(M)に相当する m/e 377 (M+1) およびそれから誘導される m/e 335, 317 などの各イオンフラグメントが検出された(Fig. 14)。

一般に、天然に存在する大部分のアミノ糖は、N-アセチル化あるいは

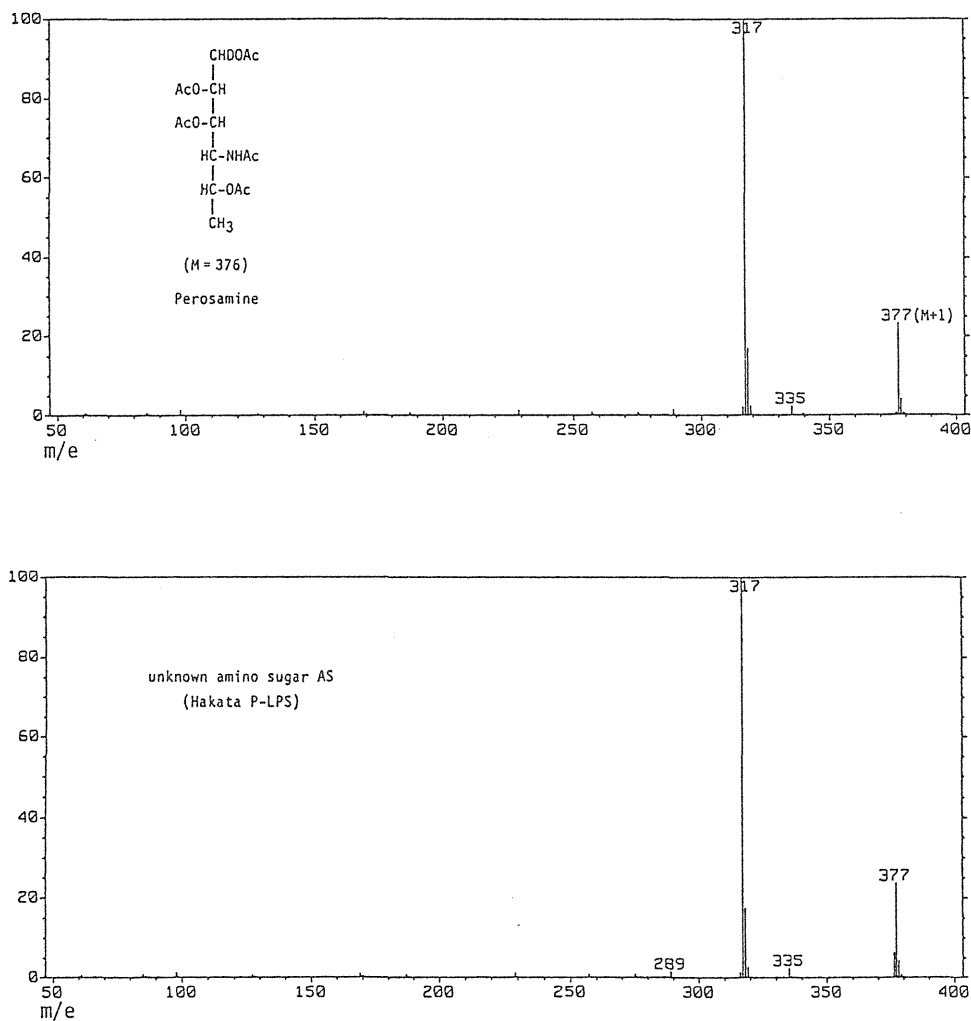


Fig. 14. Mass spectra of peracetylated derivatives of perosamine from 01 *V. cholerae* LPS and unknown amino sugar (AS) form *V. cholerae* bio-serogroup Hakata LPS in CI-MS. The condition on GC/MS analysis; program 4 in Table E-5 shown experimental part.

N-アシル化されている[58]。O1 コレラ菌 LPS に含まれるペロサミンもその例にもれず、ペロサミンの4位のアミノ基は 3-deoxy-L-glycero-tetronic acid によりアシル化されている[15,16,17]。このアミド結合は、酸加水分解(10M 塩酸・90°C・15 分)により容易に切断され、アミノ基が遊離するため、O1 コレラ菌 LPS のペロサミンは、酸加水分解後の Dowex 50 (H<sup>+</sup>) イオン交換クロマトグラフィーにおいてアミノ糖画分に分画され、また、TLC ではニンヒドリン試薬で検出することができた。しかし、AS は、酸加水分解後の Dowex 50 (H<sup>+</sup>)イオン交換クロマトグラフィーにより中性糖画分に分画され、また、TLC においてニンヒドリン試薬で発色しないなど、O1 コレラ菌 LPS のペロサミンとは異なった性状を示した。しかし、AS の完全アセチル誘導体の GLC および GC/MS 分析における性状は、O1 コレラ菌 LPS 由来のペロサミンの N-アセチル-アルジトール・アセテート誘導体のそれと同一であったことより、AS は N-アセチル・ペロサミンであることが予想された。

AS の N-置換基の同定と、Hakata P-LPS の O-抗原特異多糖側鎖の構造を解析するため、Hakata P-LPS の O-polysaccharide (結果 4-1 の Frc. II に相当する LPS の多糖体画分)について、NMR スペクトルの測定とメチル化分析を行った。対照としては、その O-抗原特異多糖側鎖が、主に、linear (1→2) linked 4,6-dideoxy-4-(N-3-deoxy-L-glycero-tetronamido)- $\alpha$ -D-mannopyranose により構成されていることが明らかにされている O1 コレラ菌 LPS [15, 16, 17]から調製した O-polysaccharide (Frc. II)を用いた。

O1 コレラ菌 LPS から調製した Intact O-polysaccharide の <sup>13</sup>C-NMR スペクトル(Fig. 15)では、LPS の O-抗原特異多糖側鎖の主要部分を構成する 4,6-dideoxy-4-(N-3-deoxy-L-glycero-tetronamido)- $\alpha$ -D-mannopyranose の homopolymer に由来する 10 本の強いシグナルと、コアオリゴ糖に由来する数本の弱いシグナルが観測された。この結果は、Kenne ら[16,17] および Redmond の報告[15]と良く一致していた。各シグナルの化学シフト値、ピーク分裂数および C-H カップリング定数(J<sub>C-H</sub>)を Table 8 に示す。各シグナルの帰属は、Kenne ら[16,17]および Red-

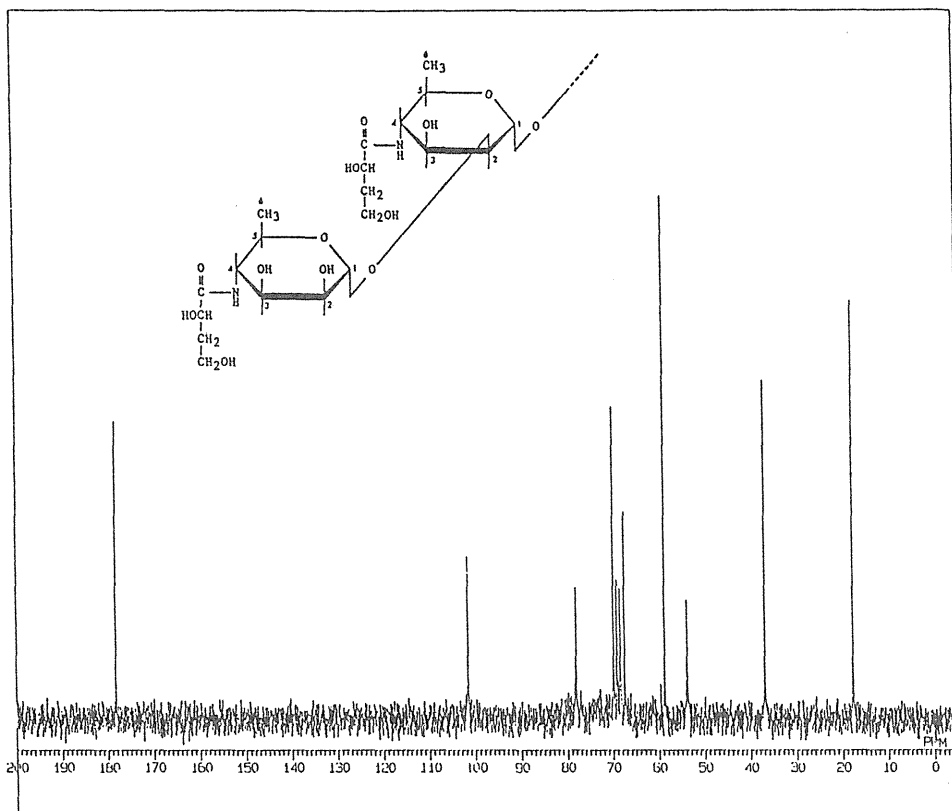


Fig. 15.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum (67.80 MHz) of the intact O-polysaccharide of O1 *V. cholerae* LPS. Sample was dissolved in  $\text{D}_2\text{O}$ , and chemical shifts were reported downfield from internal 1,4-dioxane (67.40 ppm).

mond の報告[15]に従って行った。Perry らの方法[45]により N-脱アシ  
ル化した O1 コレラ菌 LPS の O-polysaccharide (N-deacylated O-  
polysaccharide)では、N-アシル基である 3-deoxy-L-glycero-tetronic  
acid の炭素原子に由来する 178.20 ppm (C'-1:-NHCO-), 69.82 ppm (C'-  
2: >CHOH), 36.80 ppm (C'-3: -CH<sub>2</sub>-) および 58.69 ppm (C'-4: -CH<sub>2</sub>OH)  
の各シグナルは消失し、perosamine homopolymer backbone に由来する  
6 本の強いシグナルが観測された (Table 8)。また、N-deacylated O-

Table 8.  $^{13}\text{C}$ -NMR shifts of the intact and modified O-polysaccharide isolated from 01 V. cholerae LPS and V. cholerae bio-serogroup Hakata LPS

	Chemical shifts			
Carbon atoms	01 <u>V. cholerae</u>			
	Intact O-polysaccharide	N-deacylated O-polysaccharide	N-acetylated O-polysaccharide	Hakata intact O-polysaccharide
	ppm (splitting, J <sub>C-H</sub> Hz)			
(Perosamine backbone)				
C-1	101.52(d, 174.1)	101.55(d, 174.2)	101.34(d, 174.1)	101.33(d, 174.0)
C-2	77.99(d, 150.9)	77.60(d, 152.0)	77.88(d, 150.9)	77.86(d, 152.0)
C-3	68.30(d, 43.0)	67.89(d, 40.8)	68.67(d, 38.6)	68.67(d, 40.1)
C-4	53.76(d, 142.2)	54.77(d, 145.5)	53.91(d, 147.6)	53.91(d, 147.7)
C-5	69.07(d, 43.0)	69.32(d, 39.6)	69.33(d, 40.7)	69.33(d, 40.8)
C-6	17.64(q, 127.1)	17.66(q, 127.8)	17.63(q, 127.4)	17.64(q, 127.8)
(N-acyl group)				
3-deoxy-L-glycero- tetronic acid				
C'-1	178.20(s)	—	—	—
C'-2	69.82(d, 47.4)	—	—	—
C'-3	36.80(t, 127.3)	—	—	—
C'-4	58.69(t, 141.6)	—	—	—
acetic acid				
C"-1	—	—	175.56(s)	175.52(s)
C"-2	—	—	22.98(q, 128.5)	23.00(q, 128.9)

Abbreviations:  $J_{\text{C-H}}$ , C-H coupling constant; s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet. Samples were dissolved in  $\text{D}_2\text{O}$ , and chemical shifts were reported downfield from internal 1,4-dioxane (67.40 ppm).

polysaccharide を Lüderitz らの方法[27]で N-アセチル化した O-polysaccharide (N-acetylated O-polysaccharide) の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (Fig.16) では、perosamine homopolymer backbone に由来する 6 本のシグナルの他に、N-アセチル基に由来する 175.56 ppm ( $\text{C}''\text{-1}$ :  $\text{-NHCO-}$ ) と 22.98 ppm ( $\text{C}''\text{-2}$ :  $\text{-CH}_3$ ) のシグナルが観測された (Table 8)。Hakata LPS から調製した O-polysaccharide の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル (Fig. 17) は、O1 コレラ菌の N-acetylated O-polysaccharide のそれと同一で

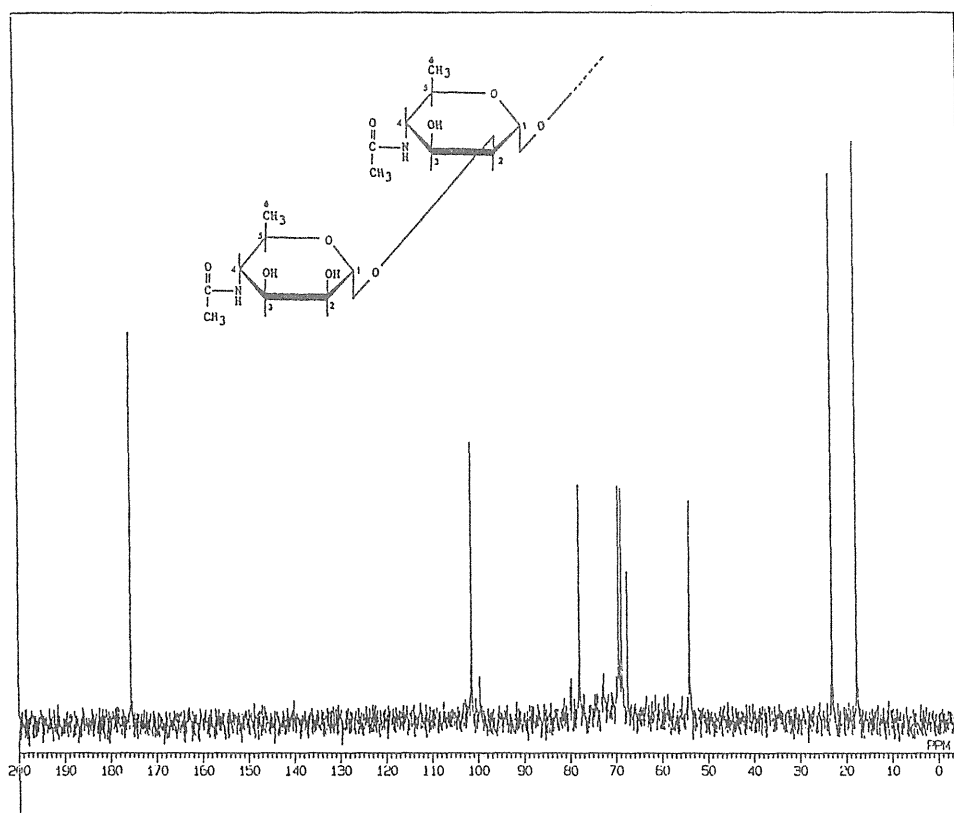


Fig. 16.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum (67.80 MHz) of the N-acetylated O-polysaccharide of O1 *V. cholerae* LPS. Sample was dissolved in  $\text{D}_2\text{O}$ , and chemical shifts were reported downfield from internal 1,4-dioxane (67.40 ppm).

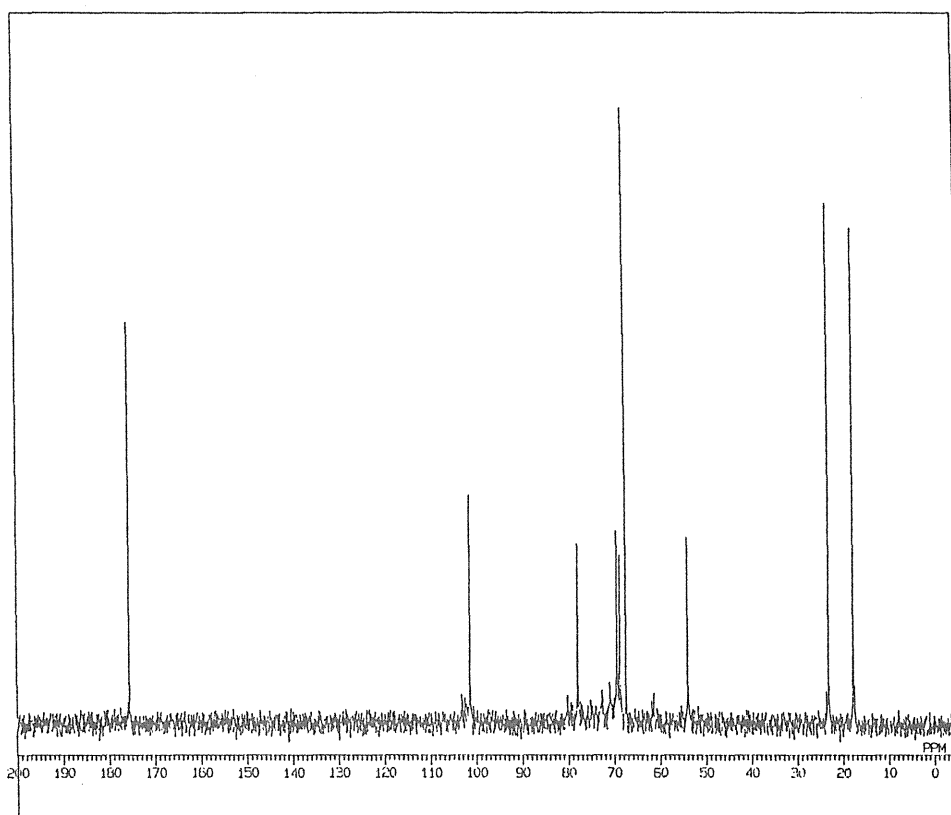


Fig. 17.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum (67.80 MHz) of the intact O-polysaccharide of the phenol-phase LPS isolated from *V. cholerae* bio-serogroup Hakata. Sample was dissolved in  $\text{D}_2\text{O}$ , and chemical shifts were reported down-field from internal 1,4-dioxane (67.40 ppm).

あり、perosamine homopolymer backbone に由来すると思われる 101.33 ppm (doublet,  $J_{\text{C-H}}$  174.0 Hz, C-1), 77.96 ppm (doublet,  $J_{\text{C-H}}$  152.0 Hz, C-2), 68.67 ppm (doublet,  $J_{\text{C-H}}$  40.1 Hz, C-3), 53.91 ppm (doublet,  $J_{\text{C-H}}$  147.7 Hz, C-4), 69.33 ppm (doublet,  $J_{\text{C-H}}$  40.8 Hz, C-5) および 17.64 ppm (quartet,  $J_{\text{C-H}}$  127.8 Hz, C-6) の各シグナルと、N-アセチル基に由来すると思われる 175.52 ppm (singlet, C"-1:  $\text{-NHCO-}$ ) と 23.00 ppm (quartet,  $J_{\text{C-H}}$  128.9 Hz, C"-2:  $\text{-CH}_3$ ) のシグナルが観測

された (Table 8)。また、Fig. 18 と Fig. 19 に示すように、Hakata O-polysaccharide と O1コレラ菌の N-acetylated O-polysaccharide の  $^1\text{H}$ -NMRスペクトルもよく類似しており、ともにペロサミンの 6 位のメチルプロトン および N-アセチル基のメチルプロトンにそれぞれ由来する 1.06 ppm (broad doublet) と 1.91 ppm (singlet) のシグナルが観測され、また、5.02 ppm (broad singlet) にアノマープロトンのシグナルが認められた。

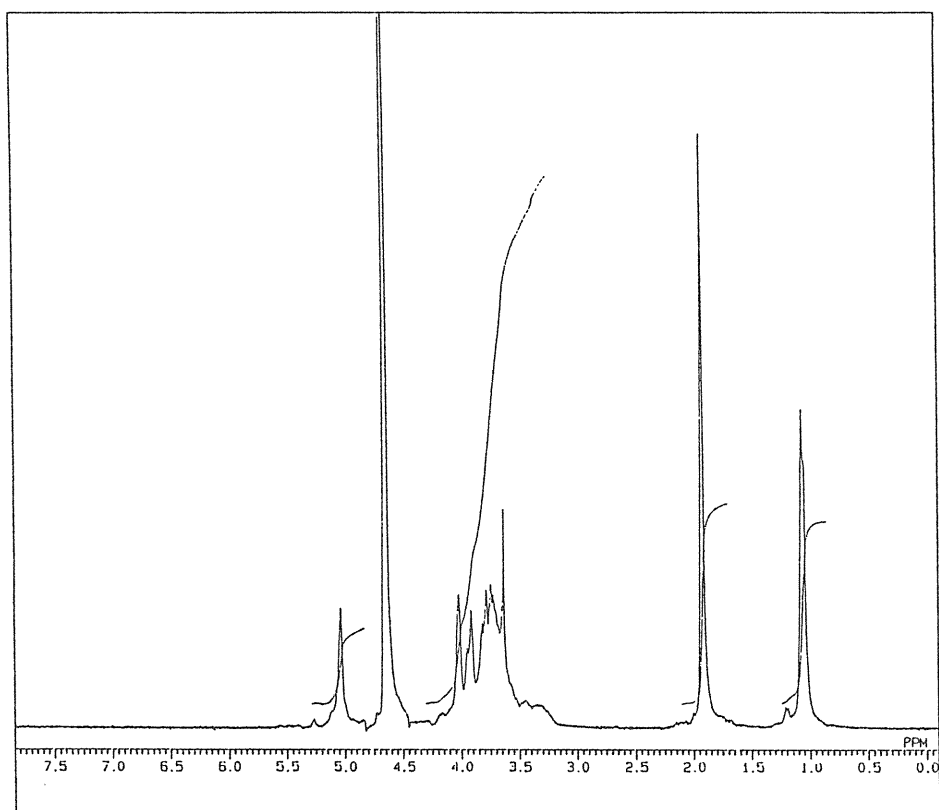


Fig. 18.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum (270.05 MHz) of the N-acetylated O-polysaccharide of O1 *V. cholerae* LPS. Sample was dissolved in  $\text{D}_2\text{O}$ , and chemical shifts were reported downfield from HOD-signal (4.65 ppm).

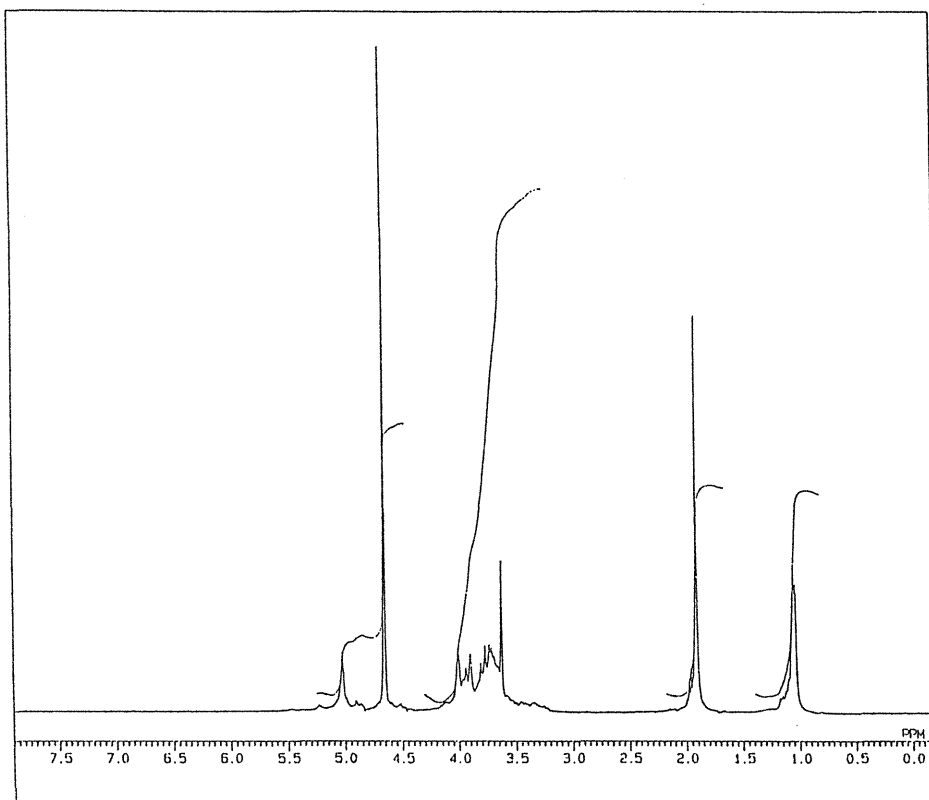


Fig. 19.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum (270.05 MHz) of the intact O-polysaccharide of the phenol-phase LPS isolated from *V. cholerae* bio-serogroup Hakata. Sample was dissolved in  $\text{D}_2\text{O}$ , and chemical shifts were reported downfield from HOD-signal (4.65 ppm).

Bock ら [59,60] は、ヘキソピラノース環を持つ多くの糖質の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを測定し、アノマーの炭素原子と水素原子間のカップリング定数 ( $J_{\text{C1-H1}}$ ) を検討した結果、 $\alpha$ -アノマー(エクアトリアル H-1)の  $J_{\text{C1-H1}}$  は 170 Hz 前後であり、 $\beta$ -アノマー(アキシアル H-1)のそれは 160 Hz 前後であることを明らかにした。Hakata O-polysaccharide の  $J_{\text{C1-H1}}$  は 174.0 Hz であり、O1 コレラ菌の Intact, N-deacylated および N-acetylated O-polysaccharide のそれとほぼ同一であった (Table 18)。



また、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (Fig. 18, 19) のアノマー領域に観測された broad singlet (5.02 ppm) のシグナルは、 $\alpha$ -D-manno-pyranosyl 結合のアノマープロトンに特徴的なもの[61]であることから、Hakata 株 LPS のO-抗原特異多糖側鎖を構成する AS は  $\alpha$ -配位であることが示唆された。

O-抗原特異多糖側鎖の主要部分が linear 1 $\rightarrow$ 2 linked 4,6-dideoxy-4-(N-acetamido)- $\alpha$ -D-mannopyranose により構成されている O1コレラ菌 N-acetylated O-polysaccharide を対照として用いた Hakata O-polysaccharide に関するメチル化分析では、GLCにおける保持時間 20.6 分に 1 $\rightarrow$ 2 結合であることを示す 1,2,5-tri-O-acetyl-3-O-methyl-4,6-dideoxy-4-(N-methylacetamido)-[1- $^2\text{H}$ ]-mannitol のメインピークと 18.1 分に非還元末端糖に相当する 1,5-di-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-4,6-dideoxy-4-(N-methylacetamido)-[1- $^2\text{H}$ ]-mannitol のピークが検出された。それぞれのマススペクトルを Fig.20 と Fig. 21 に示した。1,2,5-tri-O-acetyl-3-O-methyl-4,6-dideoxy-4-(N-methylacetamido)-[1- $^2\text{H}$ ]-mannitol の CI-MS 分析では、分子イオンに相当する  $m/e$  363 ( $M+1$ )とそれから誘導される  $m/e$  303, 261 の各イオンフラグメントが観察され、また EI-MS では 1,2-di-O-acetyl-3-O-methyl-4-deoxy-4-(N-methylacetamido)であることを示す  $m/e$  275, 233, 190, 130 および 5-O-acetyl-4,6-dideoxy-4-(N-methylacetamido)であることを示す  $m/e$  172, 130, 112 などの各イオンフラグメントが観察された (Fig. 20)。同様に、1,5-di-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-4,6-dideoxy-4-(N-methylacetamido)-[1- $^2\text{H}$ ]-mannitol の CI-MS では、分子イオンに相当する  $m/e$  335 ( $M+1$ ) とそれから誘導される  $m/e$  303, 275 の各イオンフラグメントが観察され、また、EI-MSでは 1-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-4-deoxy-4-(N-methylacetamido)であることを示す  $m/e$  247, 162, 118, 102 および 3-O-methyl-5-O-acetyl-4,6-dideoxy-4-(N-methylacetamido)であることを示す  $m/e$  216, 172, 130, 112 などの各イオンフラグメントが観察された (Fig. 21)。1,2,5-tri-O-acetyl-3-O-methyl-4,6-dideoxy-4-(N-methylacetamido)-[1- $^2\text{H}$ ]-mannitol と 1,5-di-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-4,6-

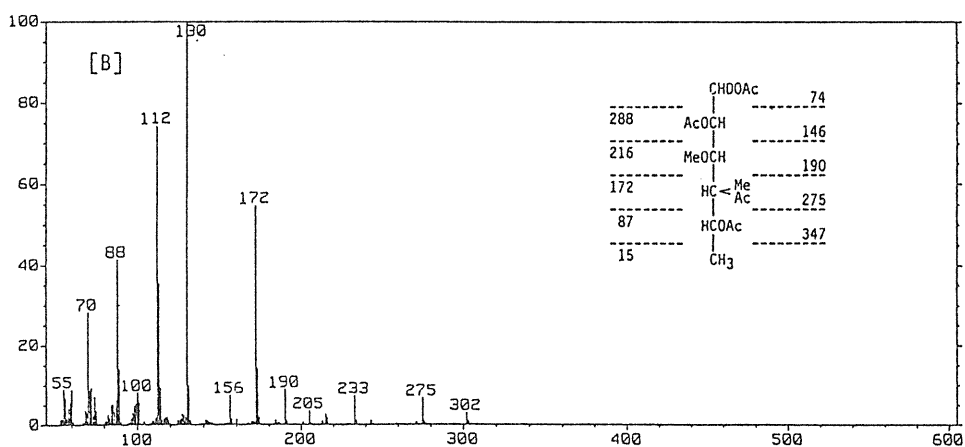
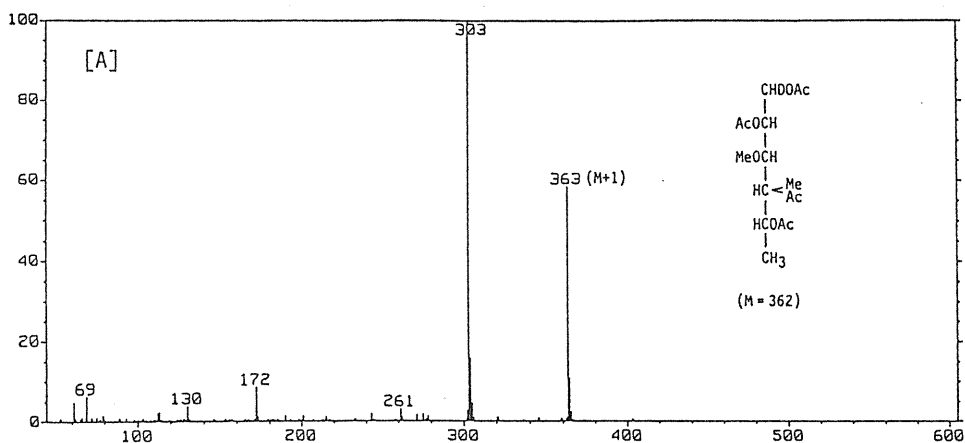


Fig. 20. Mass spectra of 1,2,5-tri-O-acetyl-3-O-methyl-4,6-dideoxy-4-(N-methylacetamido)-D-[1-<sup>2</sup>H]-mannitol in [A] CI-MS and [B] EI-MS. The condition on GC/MS analysis; program 4 in Table E-5 shown in experimental part.

dideoxy-4-(N-methylacetamido)-[1-<sup>2</sup>H]-mannitol の GLC 分析における検出比はおよそ 6:1 であり、Hakata株 DPS の Frc. II (Table3)に含まれる AS 量(7 モル-AS/3 モル-ヘプト-ス)と一致していた。

以上、GLC, GC/MS 分析および NMR 解析の成績から、Hakata 株 LPS に見出された未同定アミノ糖(AS)は 4,6-dideoxy-4-(N-acetamido)-α-D-

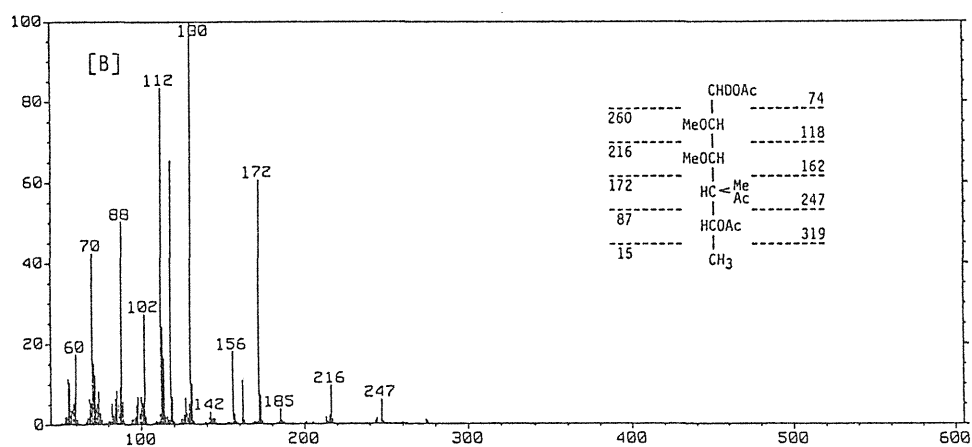
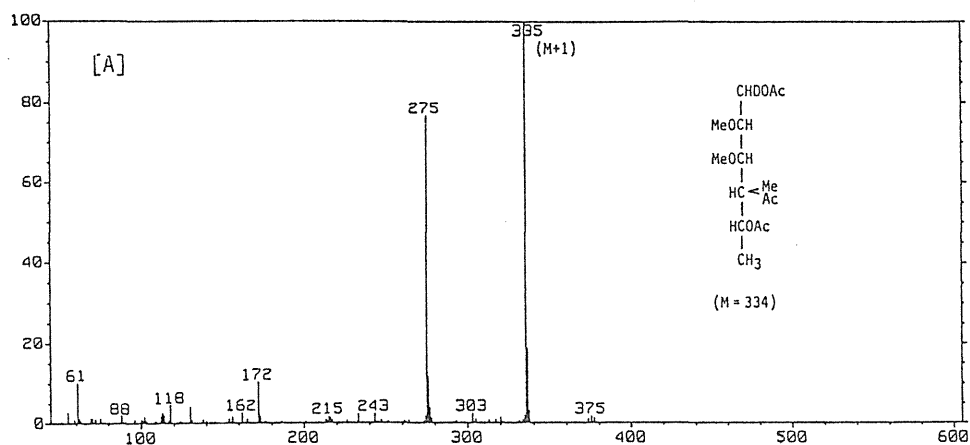


Fig. 21. Mass spectra of 1,5-di-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-4,6-dideoxy-4-(N-methylacetamido)-D-[1-<sup>2</sup>H]-mannitol in [A] CI-MS and [B] EI-MS. The condition on GC/MS analysis; program 4 in Table E-5 shown in experimental part.

mannose (N-アセチルペロサミン)であり、また、Hakata LPS の O-抗原特異多糖側鎖は、主に、ヘプトース 3 モルに対して 7 モルの N-アセチルペロサミンが  $\alpha 1 \rightarrow 2$  結合した linear homopolymer により構成されていることが明らかになった。

## 第 8 節. LPS の脂肪酸組成とリピド A バックボンの構造確認

O1 コレラ菌, *Vibrio* bio-serogroup 1875, *V. fluvialis* 181-86, *V. cholerae* bio-serogroup Hakata 各 LPS の脂肪酸組成を検討した。Table 9 に示したように、O1 コレラ菌 LPS は、主要構成脂肪酸として、テトラデカン酸 (C14:0)、ヘキサデカン酸 (C16:0)、3-ヒドロキシドデカン酸 (3-OH C12:0) および 3-ヒドロキシテトラデカン酸 (3-OH C14:0) を含み、また、少量の不飽和脂肪酸 (ヘキサデセン酸 C16:1, オクタデセン酸 C18:1) を含んでいた。これらの脂肪酸は、1875 株 LPS, Kobe 株 LPS, Hakata 株 LPS から検出された。しかし、これらの LPS では、O1 コレラ菌 LPS と比較して、不飽和脂肪酸 (C16:1, C18:1) の含量が高く、また、ヒドロキシ脂肪酸 (3-OH C12:0, 3-OH C14:0) の含量が若干低いことが特徴であった。さらに、1875 株 LPS と Kobe 株 LPS は、O1 コレラ菌 LPS に含まれる脂肪酸の他に、それぞれ 1 種 および 2 種の未同定脂肪酸を含み、定性的に O1 コレラ菌 LPS とは相違した脂肪酸組成を持つことが明らかになった。

1875 Original LPS と 1875 Variant LPS, また Kobe W-LPS と Kobe PCP-LPS は、それぞれほぼ類似した脂肪酸組成を持っていた。しかし、Hakata P-LPS と Hakata W-LPS 間の脂肪酸組成には定量的な相違が認められ、Hakata P-LPS は、Hakata W-LPS に比較して多量の C16:0, C16:1 を含み、逆に、3-OH C14:0 含量が低かった。また、*Vibrio* bio-serogroup 1875 のアセトン乾燥菌体から PCP 抽出 [20] によって得られた NL は、1875 Original 由来 NL, 1875 Variant 由来 NL とともに、構成脂肪酸として多量の C16:0, C16:1, C18:1 を含み、また、ヒドロキシ脂肪酸の含量が著しく低いなど、1875 Original LPS, 1875 Variant LPS とは非常に異なった脂肪酸組成を持つことが明らかになった。

また、各 LPS のリピド A バックボンの構造を確認するためメチル化分析を行った結果、プログラム 5 (実験の部 Table E-5) による GC/MS 分析において、保持時間 35.5 分に Fig. 22 に示したようなマススペクトルを与える物質が検出された。本物質の CI-MS (Fig. 22 A) では、M+1 に

Table 9. Fatty acid composition of LPS isolated from V. cholerae, Vibrio bio-serogroup 1875 and V. fluvialis 181-86 Kobe (% w/w)

	C14:0	C16:0	C16:1	C18:1	3-OH C12:0	3-OH C14:0	FA <sup>a)</sup>	
							I	II
01 <u>V. cholerae</u> NIH 41	13.1	15.4	0.8	0.8	36.0	33.9	—	—
1875 Original	17.5	11.8	12.1	9.1	13.6	26.1	—	9.8
1875 Variant	17.5	11.3	13.1	8.1	15.2	23.6	—	11.2
1875 Original NL	2.7	23.9	38.4	31.7	2.0	1.3	—	—
1875 Variant NL	4.8	24.1	36.7	27.3	3.7	3.4	—	—
Kobe water phase	16.0	6.9	14.1	9.0	10.0	20.8	6.8	16.4
Kobe PCP	11.4	9.2	16.8	11.0	9.6	15.4	6.9	19.7
Hakata phenol phase	8.9	29.8	22.8	13.8	13.3	11.4	—	—
Hakata water phase	18.0	15.2	10.0	6.4	19.9	30.5	—	—

Values for fatty acids are percentages of the total fatty acid fraction. a) FA, unknown fatty acid. Abbreviations: C14:0, tetradecanoic acid; C16:0, hexadecanoic acid; C16:1, hexadecenoic acid; C18:1, octadecenoic acid; 3-OH-C12:0, 3-hydroxy-dodecanoic acid; 3-OH-C14:0, 3-hydroxy-tetradecanoic acid. All fatty acids were determined by gas-liquid chromatography using program 3 (Table E-5) as methyl-ester derivatives after acid hydrolysis in 4 M-HCl at 100°C for 4 hr.

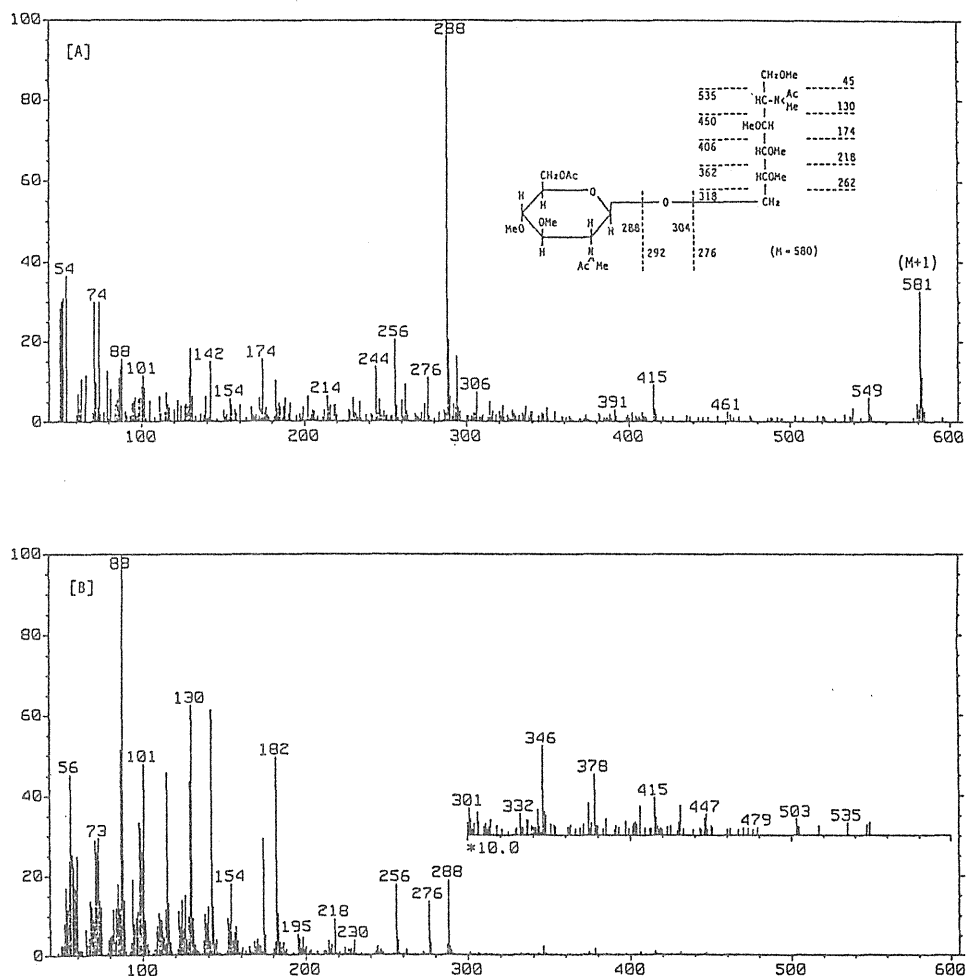


Fig. 22. Mass spectra of the partially methylated and acetylated derivative of reduced-lipid A backbone isolated from *V. cholerae* Hakata W-LPS. [A] CI-MS. [B] EI-MS. The condition on GC/MS analysis; program 5 in Table E-5 shown in experimental part.

相当すると思われる  $m/e$  581 のイオンフラグメントと本物質が二量体であることを示す  $m/e$  288 のイオンフラグメントが観察され、また、EI-MS (Fig. 22 B)では、本物質がグルコサミンの二量体であることを示す  $m/e$  535, 503, 288, 276, 256 の各イオンフラグメント、および 1→6 結合のグルコサミン二量体に特徴的なイオンフラグメント [64]である  $m/$

e 218 が観察されたことから、本物質は LPS のリピド A バックボーンに由来する 1→6 結合 グルコサミニ・グルコサミニトールのメチル・アセチル誘導体と同定した。すなわち、これらの各 LPS のリピド A バックボーンは、一般グラム陰性細菌 LPS の場合[10]と同様、1→6 結合のグルコサミン二量体から成ることが明らかになった。

## [考 察]

本章では、O1 コレラ菌と共通抗原性を持つ 3 種のビブリオから分離・精製した LPS、特に、衛生行政上重要視されている *V. cholerae* bio-serogroup Hakata の LPS を中心に、その化学的性状を追究した。

*V. fluvialis* は、近年、医学的・食品衛生的見地から注目を浴びている新病原ビブリオであり、従来、島田・坂崎[8]により 18 種の O-抗原型、久恒ら[62]により 14 の化学型に分類されていた。また、現在までに、*V. fluvialis* の O4, O5, O10 は、それぞれ non-O1 グループ・コレラ菌の O41, O39, O6 と共通抗原性を持つことが化学的・血清学的に明らかにされている[8]。*V. fluvialis* 181-86 Kobe は、島田・坂崎[7]の血清学的研究により、O1 から O18 のどの *V. fluvialis* と異なる抗原型を持ち、かつ、O1 コレラ菌と共通抗原性を持つことが示され、*V. fluvialis* O19 として新に分類された。本研究において、*V. fluvialis* 181-86 Kobe から分離・精製した LPS は、*V. fluvialis* LPS の常成分である D-グリセロ-D-マンノヘプトースとウロン酸の他に O1 コレラ菌 LPS の特異糖であるペロサミンとキノボサミンを含むことが明らかとなり、本菌株は化学的にも新しい型（化学型 15）に分類できた。また、本株の O-抗原因子は *Vibrio* bio-serogroup 1875 Variant の O-抗原因子と同一であることが島田・坂崎[7]により報告されたが、本研究において、化学的にも両者の LPS O-抗原特異多糖側鎖部分は非常に類似していることが明らかになった。

O1 コレラ菌 LPS の O-抗原特異多糖側鎖部位は、主に、3-deoxy-L-glycero-tetronic acid によって N-アシル化されたペロサミンが  $\alpha(1 \rightarrow 2)$  結合した linear homopolymer により構成されていることが知られている[15,16,17]。また、久恒ら[19,63]は、多数のビブリオ科細菌 LPS の糖組成を検討した結果、O1 コレラ菌の LPS のみにペロサミンとキノボサミンが存在することを見出し、この 2 つの糖成分が O1 コレラ菌の O-抗原特異性に関与しているのではないかと推考した。本研究において、O1 コレラ菌と共通抗原性を持つ 3 種のビブリオ、*Vibrio* bio-



serogroup 1875, *V. fluvialis* 181-86 Kobe, *V. cholerae* bio-serogroup Hakata の各 S 型 LPS にも、このペロサミンとキノボサミンが存在することが明らかになった。また、LPS の degradation study により、ペロサミンとキノボサミンは、各 LPS の O-抗原特異多糖側鎖部位に存在していることが明らかになった。一般に、LPS の持つ抗原特異性は、O-抗原特異多糖側鎖部分の構造様式により決定される[10]。O1 コレラ菌 LPS とこれらの菌株の LPS の O-抗原特異多糖側鎖部分に存在する共通糖成分は、ペロサミンとキノボサミンのみであることから、この 2 の糖質は、少なくとも O1 コレラ菌とこれらの菌株との共通抗原因子である Ogawa 因子 B, Inaba 因子 C に関与しているものと思われる。また、本研究により、1875 株, Kobe 株, Hakata 株の各 LPS に見出されたマンノース、1875 株 LPS と Kobe 株 LPS に含まれる未同定物質(NS I, NS II)、および Hakata 株 LPS から検出され、後に N-アセチル・ペロサミンであることが確認できた未同定アミノ糖 AS も、各 LPS の O-抗原特異多糖側鎖部位に存在することが明らかになった。各 LPS におけるこれらの糖成分の分布パターンと Fig. 1 に掲げた各菌株が持つ O-抗原因子から、1875 株, Kobe 株 および Hakata 株の各 LPS に存在するマンノースは、これら 3 菌株の共通抗原因子である D に、また、1875 株 LPS と Kobe 株 LPS に見出された未同定物質(NS I, NS II)は、両者の共通抗原因子である E にそれぞれ対応し、さらに、Hakata 株 LPS のみに含まれる N-アセチル・ペロサミンは、Hakata 独自の抗原因子である F に相当するものと考えられた。

サルモネラ等の一般グラム陰性細菌の LPS では、LPS 1 分子あたり 3 モルの KDO が存在し、そのうちの 1 モルの KDO が、ヘプトース ( $\alpha 1 \rightarrow 5$ ) KDO ( $\alpha 2 \rightarrow 6'$ ) リピド A バックボンの結合様式により、LPS の多糖部分とリピド A 部分とを連結している[64]。他の 2 モルの KDO は、二量体として上述の KDO 分子に ( $\alpha 2 \rightarrow 4$ ) のケトシド結合で分枝状に結合している[64]。KDO 検出の常法である Weissbach の反応[37]では、まず弱酸処理(0.01M 硫酸・100°C・20 分)によって、これらのケトシド結合が切断され、ついで遊離した 2 分子の KDO の過ヨウ素酸酸化により

生ずる  $\beta$ -formyl-pyruvate がチオバルビツール酸で発色する。また、同弱酸処理では、LPS 多糖部分とリピド A 部分を連結する KDO のヘプトースとのグリコシド結合は切断されないが、この 5 位にヘプトースが置換した KDO も mono-置換体の状態で Weissbach の反応にある程度の発色を示すことが知られている [65]。しかし、久恒ら [19,53] は、V. parahae-molyticus O6 と Plesiomonas 属を除く全てのビブリオ科細菌の LPS からは、大きな特徴として、温和な条件下に加水分解を行う Weissbach の反応 [37] では KDO が検出されないことを見出した。また、久恒ら [19, 53] は、Plesiomonas 属を除くビブリオ科細菌 LPS の強酸加水分解物中に KDO のリン酸化誘導体が存在することを明らかにした。さらに、Brade [66] は、O1 コレラ菌 Ogawa, Inaba の LPS から、KDO の 5 位がリン酸により置換された 5-0-phosphoryl KDO を検出している。本研究に供した Vibrio bio-serogroup 1875, V. fluvialis 181-86 Kobe, V. cholerae bio-serogroup Hakata の各 LPS は、常法の Weissbach の反応 [37] に陰性であったが、LPS を強酸で処理することにより同反応陽性となり、KDO の分析に関して、O1 コレラ菌をはじめ他のビブリオ科細菌と同様な性状を示した。また、これらの LPS の強酸加水分解産物中に見出された過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陽性物質 (X) は、高圧濾紙電気泳動実験および GC/MS 分析により、KDO のリン酸化誘導体であることが明らかになるとともに、各 LPS の多糖体部分とリピド A 部分は、4-0-phosphoryl-KDO によって連結されていることが示唆された。これらの結果は、1875 株, Kobe 株 および Hakata 各 LPS の inner core 部分が、前述した一般グラム陰性細菌 LPS のそれとは異なった分子構築を持つことを示している。すなわち、これらの LPS では、KDO の代りに 4-0-phosphoryl KDO が、[ヘプトース ( $\alpha 1 \rightarrow 5$ ) 4-0-phosphoryl KDO ( $\alpha 2 \rightarrow 6'$ ) リピド A バックボーン] の結合様式により、LPS の多糖部分とリピド A 部分とを連結し、さらに、一般グラム陰性細菌 LPS に存在するような分枝状の KDO 二量体を欠損しているものと推測される。このような構造においては、弱酸処理により遊離する KDO は存在せず、従って、過ヨウ素酸酸化によって chromogen となる  $\beta$ -formyl-pyruvate も生成されない。

弱酸処理では、ヘプトースと O-phosphoryl KDO のグリコシド結合は切断されず、また、O-phosphoryl KDO のリン酸エステル結合は酸に対して非常に安定であることが知られている [54]。従って、KDO は 4 位と 5 位の両方の水酸基が置換された di-置換体として LPS 多糖部分の還元末端に存在することになるが、この KDO の 4,5-di-置換体は、mono-置換体と異なり過ヨウ素酸・チオバルピツール酸反応で呈色しないことが知られている [65]。これらの性状から、1875 株、Kobe 株 および Hakata 株の各 LPS からは、Weissbach の方法により KDO が検出されないものと思われる。

本研究において、V. cholerae bio-serogroup Hakata LPS の O-抗原特異多糖側鎖部分は、主に、 $\alpha 1 \rightarrow 2$  結合した N-アセチル・ペロサミンの linear homopolymer により構成されていることが明らかになった。Hakata LPS に含まれる N-アセチル・ペロサミンは、酸加水分解に対して安定であり、糖分析の過程において、O1 コレラ菌 LPS に存在するペロサミン (N-3-deoxy-L-glycero-tetronyl perosamine) とは異なる挙動を示したが、いずれもバックボーンはペロサミンであり、両 LPS 間には抗原的な交叉反応原性のみでなく、糖組成においても類縁性が認められた。V. cholerae bio-serogroup Hakata は、近年の細菌学の進歩により初めて同定可能になった菌株であり、過去において、O1 コレラ菌として診断された菌株の中にも本株が含まれているものと思われる。事実、阿部ら [67] は、過去、O1 コレラ菌として保存していた菌株 (河川水由来株) の中から 17 株の V. cholerae bio-serogroup Hakata を検出している。また、阿部ら [67] は、本菌株のコレラ毒素産生能の有無をコレラ毒素 A1 サブユニットをコードする遺伝子プローブを用いたコレラ毒素遺伝子の検定と Reversed Passive Latex Agglutination (RPLA) 試験により検討した結果、V. cholerae bio-serogroup Hakata は、全株これらの試験に陰性を示し、コレラ毒素を産生しない菌株であることを示した。さらに、阿部ら [67] によって、本菌株の一部は、コントロールの O1 コレラ菌よりは弱いものの、ウサギ結紮腸管ループ試験および乳飲みマウス活性に陽性を示し、コレラ毒素以外の病原因子を産生していることが示された。

前述のように、V. cholerae bio-serogroup Hakata は、Inaba 因子 C を持ち、O1 コレラ菌抗血清と Inaba 因子血清により凝集することから、現在、検疫所や衛生試験所でのコレラ菌検査に際し混乱を来しており、本菌に対する分類学上・衛生行政上の新たな対応が迫られている。本研究において、我国で分離された 31 株の V. cholerae bio-serogroup Hakata は、LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類法により、O1 コレラ菌とは明らかに異なる化学型に分類できた。また、前述のように、本菌は O1 コレラ菌の共通抗原因子 A を欠損しているとともに、コレラ毒素を産生しない。これらの知見から、V. cholerae bio-serogroup Hakata は、分類学上、non-O1 グループ・コレラ菌として取り扱うのが妥当である。また、コレラ菌検査時の混乱を防ぐため、“コレラ菌検査の手引(厚生省発行)”を早急に改正する必要があるものとする。

## 第 2 章 LPS の血清学的性状

本章では、O1 コレラ菌 LPS および O1 コレラ菌と共通抗原性を持つ *Vibrio* bio-serogroup 1875 Original と Variant, *V. fluvialis* 181-86 Kobe および *V. cholerae* bio-serogroup Hakata の各 LPS の血清学的性状、特に、これらの LPS 間の血清学的交叉反応性を、LPS で感作したヒツジ赤血球 (SRBC) を用いる受身溶血 (passive hemolysis, PH) 反応と受身溶血阻止 (passive hemolysis inhibition, PHI) 反応を行うことにより検討した。また、化学修飾した O1 コレラ菌 LPS の血清学的性状を検討し、O1 コレラ菌 LPS の抗原特異性決定部位の解明を試みた。

### 第 1 節. 受身溶血反応

本実験では、各 LPS の抗原特異性および各 LPS 間の血清学的交叉反応性を受身溶血反応を行うことにより検討した。

O1 コレラ菌, 1875 株, Kobe 株, Hakata 株の各 LPS 感作 SRBC に対する各菌株の全菌抗血清および A, B, C, D・E, E, F 因子血清の溶血曲線を Fig. 23 から Fig. 29 に示した。また、Table 10 と Table 11 に、各感作 SRBC に対する各抗血清の 50% 溶血価 (50% 溶血を起こす抗血清の稀釈倍率) を示した。Fig. 23 から Fig. 29 では、溶血曲線が右へ移動するに従って、また、Table 10 と Table 11 では 50% 溶血価が高くなるに従って各 LPS の抗原特異性あるいは各 LPS 間の交叉反応性が高くなることを意味する。

#### 1-1. O1 コレラ菌 LPS 感作 SRBC を用いた受身溶血反応

Fig. 23 および Table 10 に示したように、O1 コレラ菌 Ogawa [O-抗原式 A・B・(c)] LPS で感作した SRBC に対し、抗 Ogawa 抗血清は 27, 400 倍の 50% 溶血価を示した。Ogawa と共通抗原性を持つ Inaba [A・C], 1875 Original [B・(c)・D・E] の両抗血清も、同 SRBC を高い titer で溶

血させたが、1875 Variant [C・D・E], Kobe [C・D・E] および Hakata [C・D・F] の各抗血清は、同 SRBC に対し溶血活性を示さなかった (Fig. 23, Table 10)。また、Fig. 27 と Table 11 に示したように、A および B 因子血清は、Ogawa LPS 感作 SRBC に対し、それぞれ 5,600 倍、2,800 倍の 50% 溶血価を示したが、Fig. 28, Fig. 29 および Table 11 に見られるように、C, D・E, E および F 因子血清の 50% 溶血価は 310 倍 ~ 200 倍以下であった。Fig. 23 と Table 10 に示したように、O1 コレラ菌 Inaba LPS 感作 SRBC は、抗 Inaba 抗血清をはじめ、A 因子を持つ Ogawa の抗血清 および C 因子を持つ 1875 Variant, Kobe 株, Hakata 株の各抗血清により溶血したが、抗 1875 Original 抗血清は本 SRBC に対し溶血活性を示さなかった。また、A 因子血清 (Fig. 27, Table 11) は、Inaba LPS 感作 SRBC を高い titer で溶血させたが、予想に反し、C 因子血清は同感作 SRBC をほとんど溶血させなかった (Fig. 28, Table 11)。

#### 1-2. 1875 LPS 感作 SRBC を用いた受身溶血反応

Fig. 24 および Table 10 に示したように、抗 1875 Original 抗血清 および 1875 Original と共通抗原性を持つ O1 コレラ菌 Ogawa, 1875 Variant, Kobe 株 および Hakata 株の各抗血清は、1875 Original LPS 感作 SRBC に対して、それぞれ 17,100 倍、11,900 倍、2,400 倍、20,400 倍 および 1,920 倍の 50% 溶血価を示したが、抗 Inaba 抗血清は、同感作 SRBC を溶血させなかった。また、Fig. 27, 28, 29 および Table 11 に示したように、1875 Original の O-抗原因子に対応する B, D・E および E 因子血清は、同感作 SRBC に対し、それぞれ 1,740 倍、1,980 倍 および 1,840 倍の 50% 溶血価を示したが、A 因子血清 (Fig. 27), C 因子血清 (Fig. 28) および F 因子血清 (Fig. 29) は溶血活性を示さなかった (Table 11)。1875 Variant LPS 感作 SRBC は、抗 1875 Variant 抗血清をはじめ、抗 Inaba, 抗 1875 Original, 抗 Kobe および抗 Hakata 抗血清で溶血し、抗 Ogawa 抗血清で溶血しなかった (Fig. 24, Table 10)。また、Fig. 28, Fig. 29 および Table 11 に示したように、同感

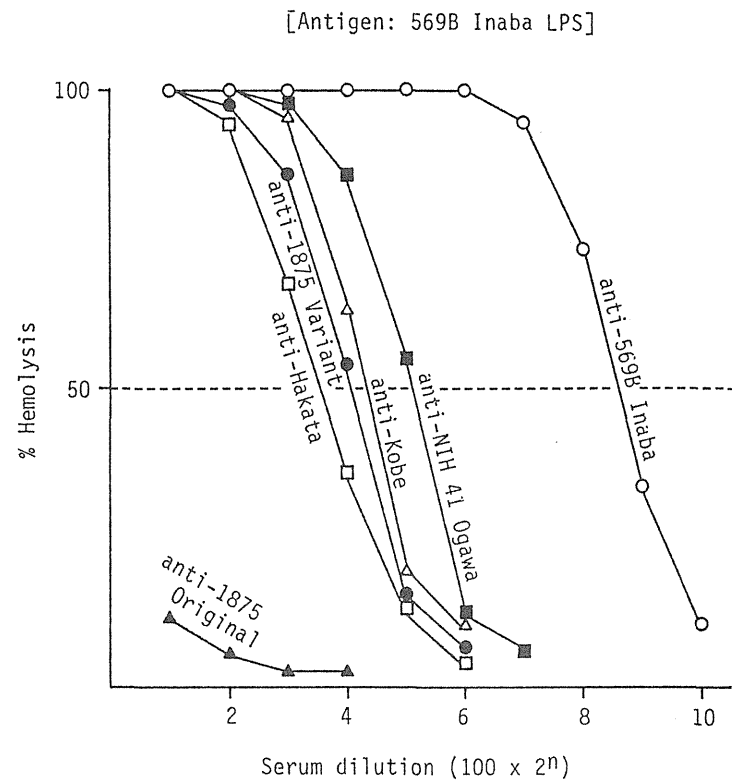
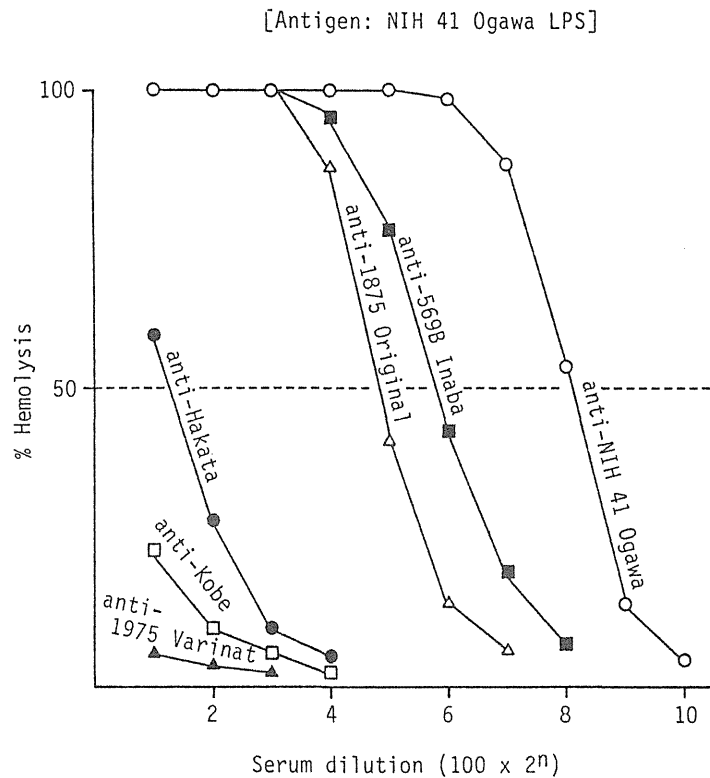


Fig. 23. Passive hemolysis of SRBC sensitized with 01 *V. cholerae* NIH 41 Ogawa and 01 *V. cholerae* 569B Inaba LPS by antisera against various strains.

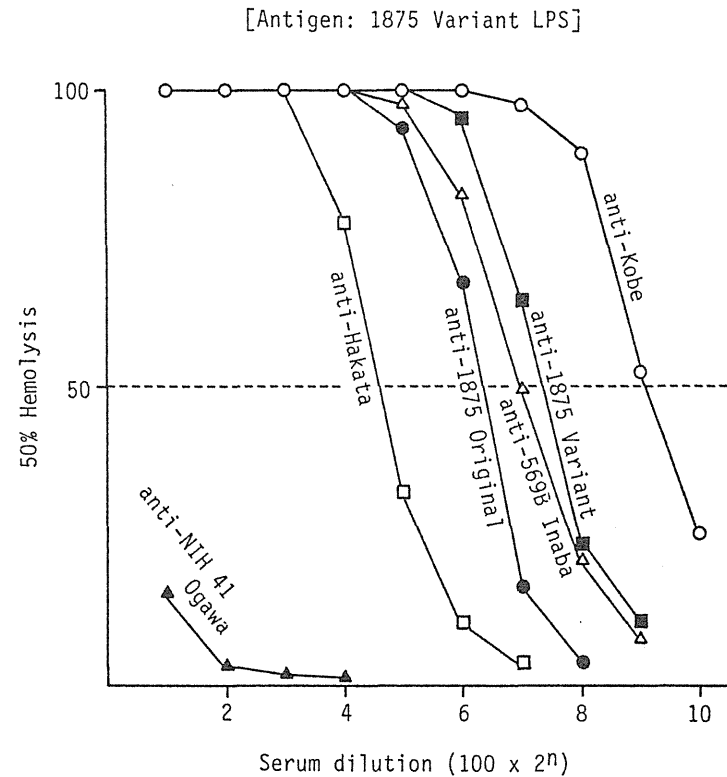
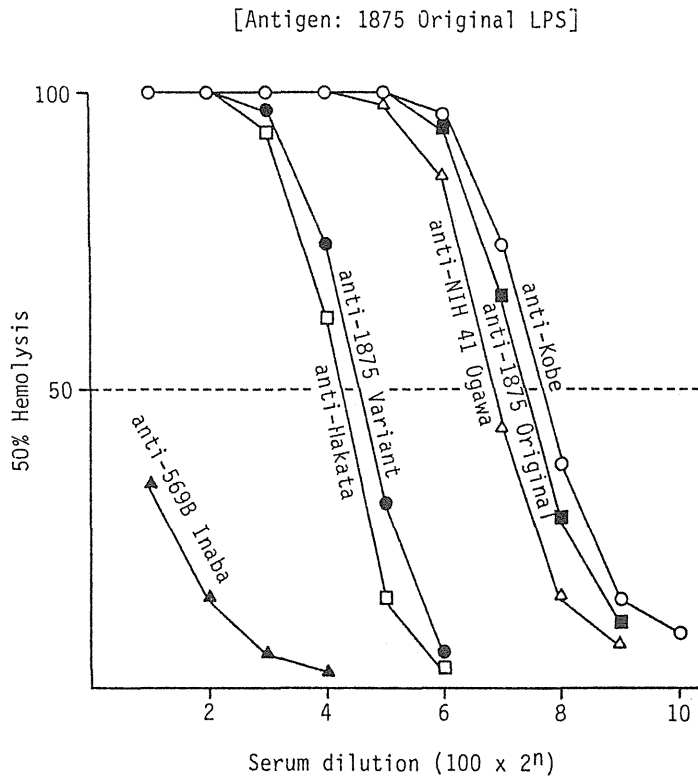


Fig. 24. Passive hemolysis of SRBC sensitized with Vibrio bio-serogroup 1875 Original and 1875 Variat LPS by antisera against various strain.



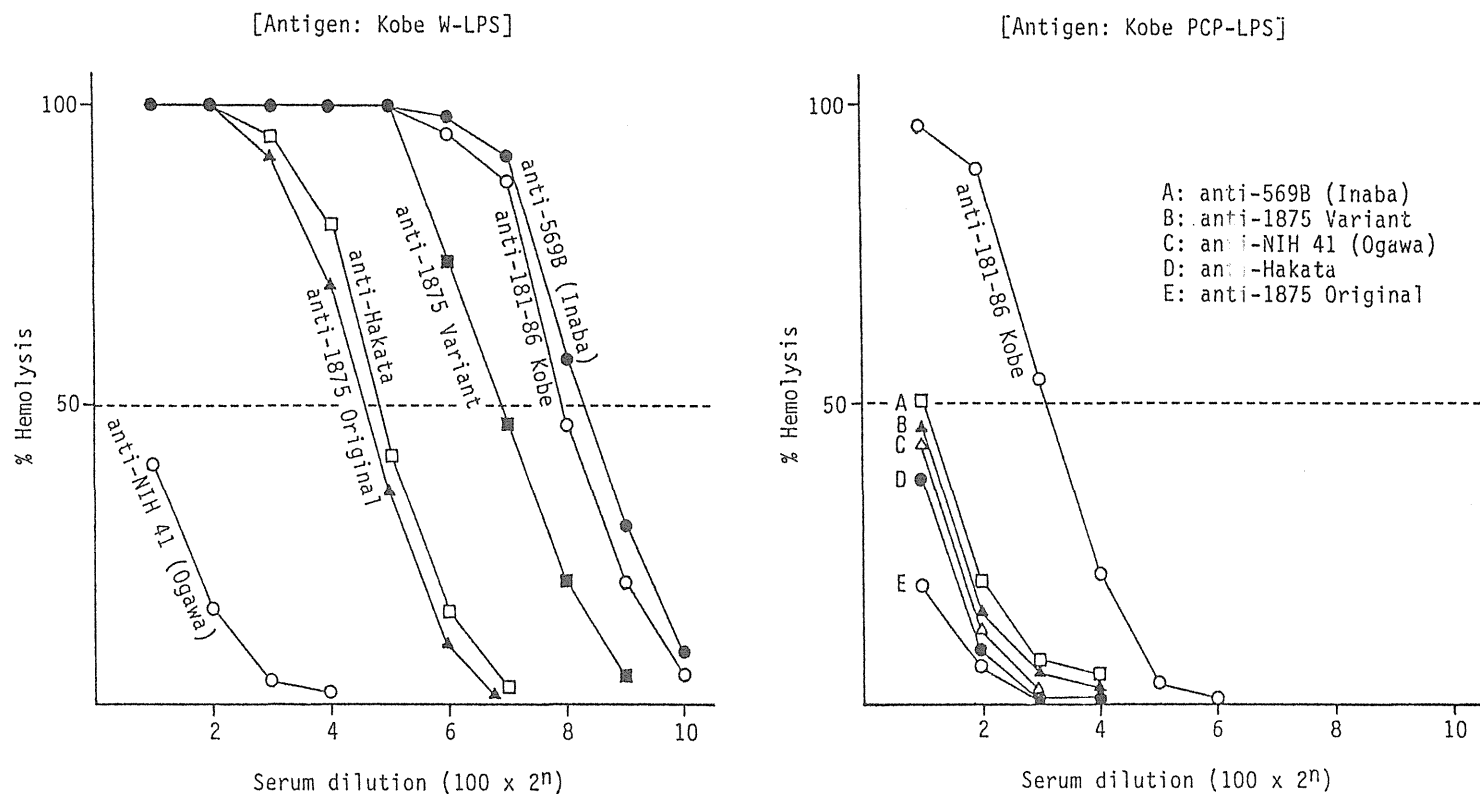


Fig. 25. Passive hemolysis of SRBC sensitized with *V. fluvialis* 181-86 Kobe W- and PCP-LPS by antisera against various strains.

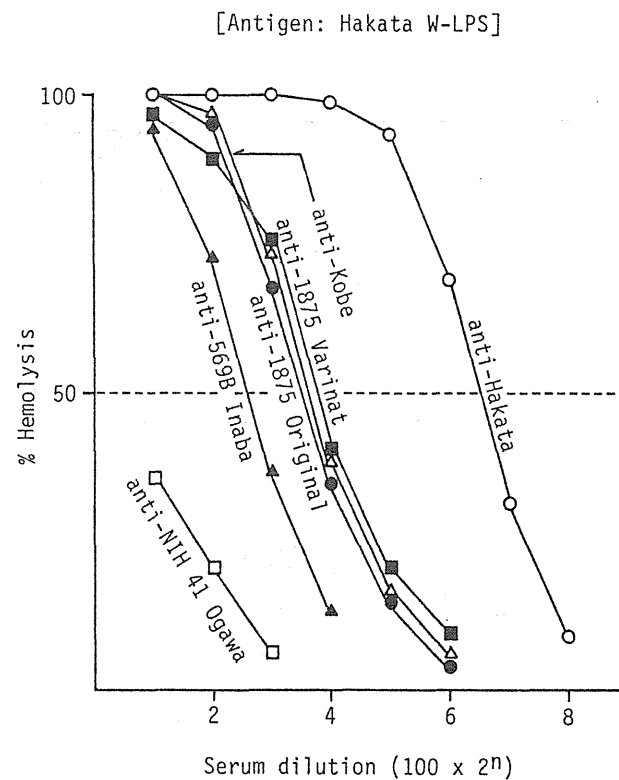
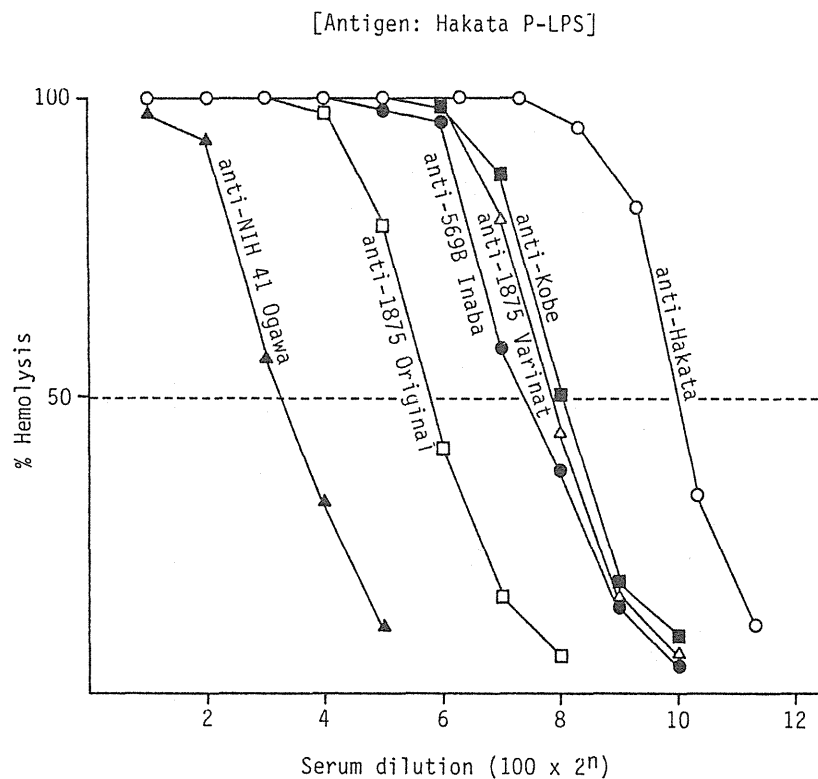


Fig. 26. Passive hemolysis of SRBC sensitized with V. cholerae bio-serogroup Hakata P- and W-LPS by antisera against various strains.

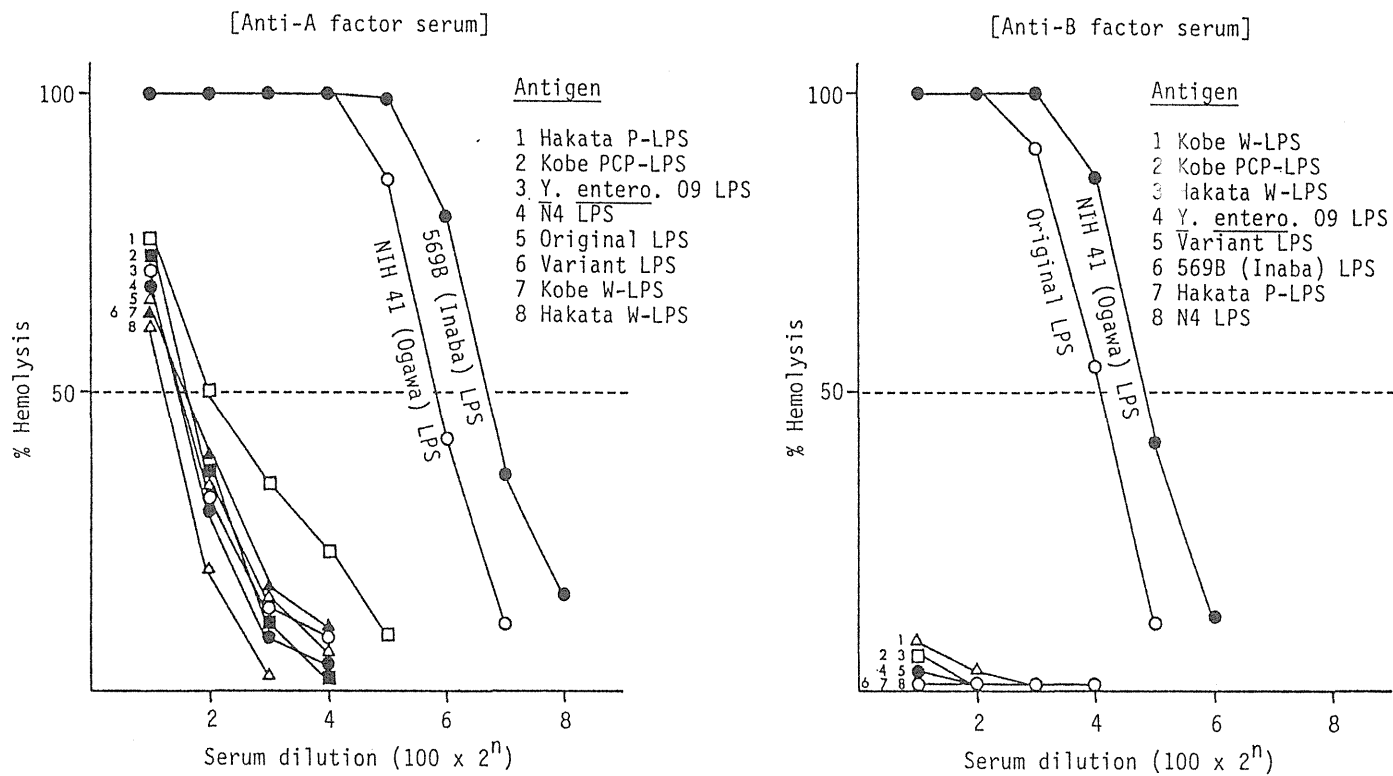


Fig. 27. Passive hemolysis of SRBC sensitized with various LPS by anti-A and anti-B factor sera.

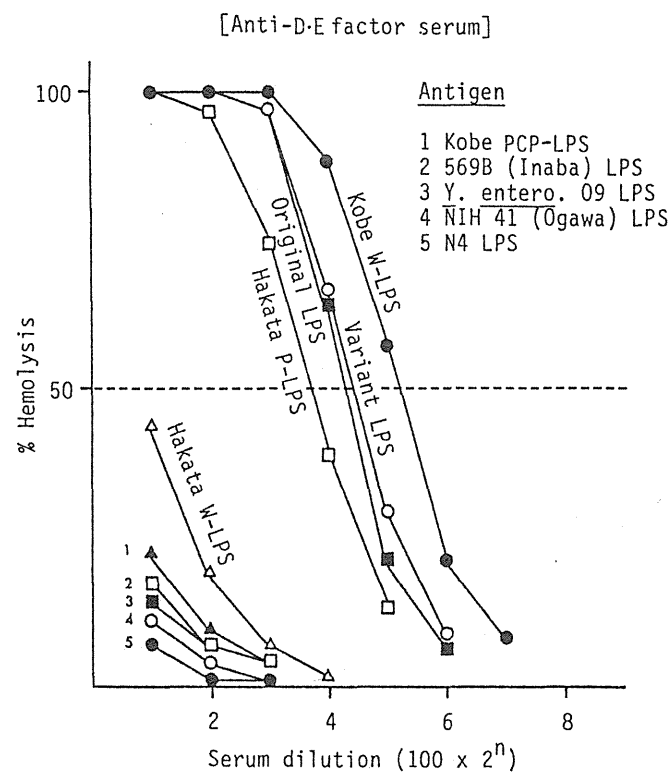
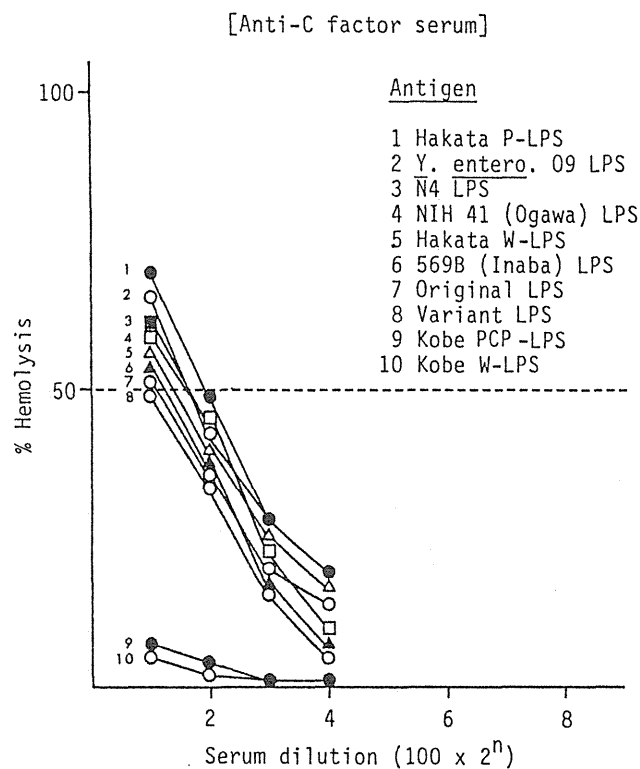


Fig. 28. Passive hemolysis of SRBC sensitized with various LPS by anti-C and anti-DE factor sera.

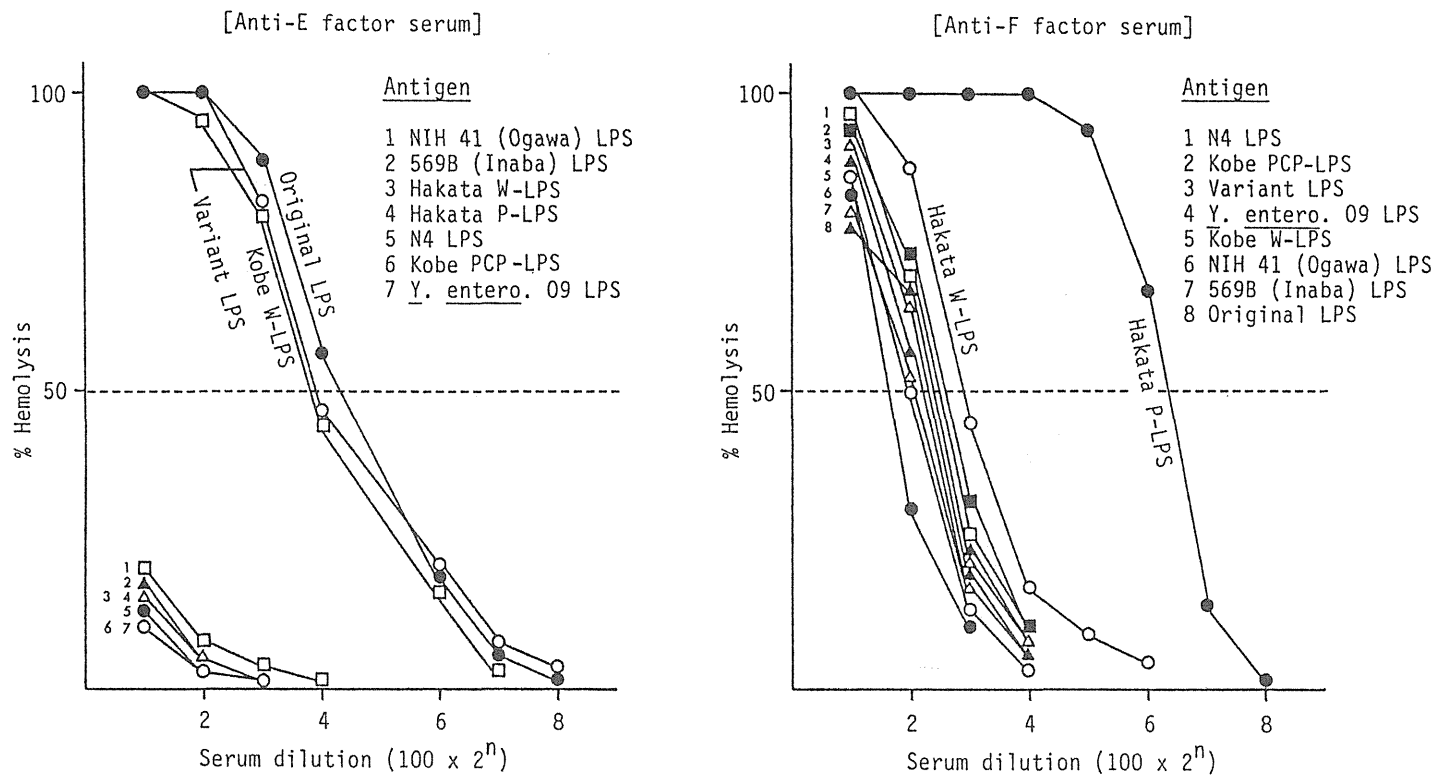


Fig. 29. Passive hemolysis of SRBC sensitized with various LPS by anti-E and anti-F factor sera.

Table 11. 50% hemolysis values of factor sera against SRBC coated with LPS isolated from each strain

LPS	factor sera					
	anti-A	anti-B	anti-C	anti-D·E	anti-E	anti-F
<u>01 V. cholerae</u>						
NIH 41 Ogawa	5,600	2,800	290	< 200	< 200	310
569B Inaba	10,300	< 200	220	< 200	< 200	410
<u>Vibrio</u> bio-serogroup 1875						
Original	300	1,740	210	1,980	1,840	530
Variant	280	< 200	< 200	2,200	1,440	500
<u>V. fluvialis</u> 181-86 Kobe						
water phase	270	< 200	< 200	3,600	1,500	400
PCP	310	< 200	< 200	< 200	< 200	570
<u>V. cholerae</u> bio-serogroup Hakata						
phenol phase	400	< 200	390	1,300	< 200	7,900
water phase	240	< 200	250	< 200	< 200	740

Passive hemolysis curve of each factor serum against SRBC coated with each LPS was shown in Fig. 27, 28 and 29.

Table 10. 50% hemolysis values of antisera against SRBC coated with LPS isolated from each strain

LPS	Antiserum					
	01 <u>V. cholerae</u>		bio-serogroup 1875		181-86 Kobe	bio-serogroup Hakata
	NIH 41 Ogawa	569B Inaba	Original	Variant		
<u>01 V. cholerae</u>						
NIH 41 Ogawa	27,400	5,600	2,800	< 200	200	450
569B Inaba	3,430	38,800	< 200	1,700	1,820	1,180
<u>Vibrio bio-serogroup 1875</u>						
Original	11,900	< 200	17,100	2,400	20,400	1,920
Variant	< 200	12,800	8,050	16,400	54,100	2,440
<u>V. fluvialis</u> 181-86 Kobe						
water phase	< 200	31,300	2,400	11,800	24,100	2,800
PCP	< 200	< 200	< 200	< 200	920	< 200
<u>V. cholerae</u> bio-serogroup Hakata						
phenol phase	990	16,900	5,400	22,400	25,800	100,400
water phase	< 200	610	1,160	1,450	1,220	9,000

Passive hemolysis curve of each antiserum against SRBC coated with each LPS was shown in Fig. 23, 24, 25 and 26.

作 SRBC に対し、D・E および E 因子血清は、それぞれ 2,200 倍、1,440 倍の 50% 溶血価を示したが、C 因子血清 (Fig. 28) は、Inaba LPS 感作 SRBC の場合と同様に、溶血活性を示さなかった (Table 11)。

#### 1-3. Kobe LPS 感作 SRBC を用いた受身溶血反応

Fig. 25 と Table 10 に示したように、Kobe W-LPS 感作 SRBC に対し、抗 Kobe 抗血清および Kobe 株と共通抗原性を持つ O1 コレラ菌 Inaba, 1875 Original, 1875 Variant, Hakata の各抗血清は、それぞれ 24,100 倍、31,300 倍、2,400 倍、11,800 倍 および 2,800 倍の 50% 溶血価を示した。また、Fig. 28, Fig. 29 および Table 11 に示したように、同感作 SRBC は、Kobe の O-抗原因子に対応する D・E および E 因子血清で溶血した (50% 溶血価: 3,600 倍、1,500 倍) が、C 因子血清を含む他の因子血清で溶血しなかった (Fig. 27, 28, 29, Table 11)。一方、Kobe PCP-LPS 感作 SRBC に対するこれらの全菌抗血清 (Fig. 25) および因子血清 (Fig. 27, 28, 29) の 50% 溶血価 (Table 10, 11) は全体的に低く、抗 Kobe 抗血清が 900 倍を示した他は、ほとんどが 200 倍以下であった。これらの成績は、化学分析で得られた結果と同様に、Kobe PCP-LPS は R 型の LPS であり、Kobe の O-抗原決定因子は主に Kobe W-LPS 分子上に存在することを示している。

#### 1-4. Hakata LPS 感作 SRBC を用いた受身溶血反応

Kobe W-LPS と Kobe PCP-LPS 間に観察された LPS の抗原特異性および他の菌株の LPS との交叉反応原性の高低の相違は、Hakata P-LPS と Hakata W-LPS 間にも認められた。Fig. 29 と Table 10 に示したように、Hakata P-LPS 感作 SRBC を用いた溶血系では、抗 Hakata 抗血清が極めて高い 50% 溶血価 (100,400 倍) を示したのをはじめ、Hakata 株と共通抗原性を持つ O1 コレラ菌 Inaba, 1875 Original, 1875 Variant および Kobe 株の各抗血清がそれぞれ高い 50% 溶血価を示した。また、D・E



因子血清 (Fig. 28) および F 因子血清 (Fig. 29) も同感作 SRBC を高い titer で溶血させた (Table 11)。他の因子血清は Hakata P-LPS 感作 SRBC を溶血せず、特に、C 因子血清は (Fig. 28)、Inaba LPS, 1875 Variant LPS および Kobe W-LPS 感作 SRBC の場合と同様に、C 因子を持つ Hakata 株の LPS 感作 SRBC に対して溶血活性を示さなかった (Table 11)。一方、Table 10 に示したように、Hakata W-LPS 感作 SRBC に対する抗 Hakata, 抗 1875 Original, 抗 1875 Variant および 抗 Kobe 抗血清の 50% 溶血価は、それぞれ 9,000 倍, 1,160 倍, 1,460 倍 および 1,220 倍であり、Hakata P-LPS 感作 SRBC に対するそれに比較して低い値を示した。特に、抗 Inaba 抗血清 (Fig. 23), D・E 因子血清 (Fig. 28) および F 因子血清 (Fig. 29) の Hakata W-LPS 感作 SRBC に対する 50% 溶血価は低く、それぞれ 610 倍, 200 倍以下 および 740 倍であった (Table 10, 11)。これらの結果は、Hakata 株 LPS に関する化学分析で得られた成績と一致しており、Hakata 株の O-抗原決定因子が主に Hakata P-LPS 分子上に存在することを示している。

以上のように、Fig. 23, 24, 25 および Table 10 に示した全菌抗血清を用いる受身溶血反応では、各 LPS 間に、Fig. 1 に掲げた各菌株の O-抗原構造式を反映する交叉反応原性が認められた。また、A, B, D・E, E および F 因子血清 (Fig. 27, 28, 29, Table 11) は、対応する抗原因子を持つ菌株由来の LPS で感作した SRBC を高い titer で溶血させたことから、これらの各因子の抗原決定基は LPS 分子上に存在していることが明らかになった。C 因子血清は、O1 コレラ菌 Inaba LPS 感作 SRBC ばかりでなく、Inaba 因子 C を持つ菌株の LPS で感作した各 SRBC に対しても溶血活性を示さなかった (Table 11)。これは、他の因子血清に比較して C 因子血清の抗体価が低いと思われる、全菌抗血清を用いた受身溶血反応において、C 因子を持つ O1 コレラ菌 Inaba と 1875 Variant, Kobe 株 および Hakata 株 から分離した各 LPS 間に明瞭な血清学的交叉反応原性が認められたことから、C 因子も、その LPS 分子上に存在しているものと考えられた。

## 第 2 節. 受身溶血阻止反応

本実験では、各 LPS の抗原特異性および各 LPS 間の血清学的交叉反応原性を受身溶血阻止反応を行うことにより検討した。

受身溶血阻止反応 (PHI) の成績を Table 12 と Table 13 に示した。表中の数値は、各溶血系における各 inhibitor LPS の 50% 溶血阻止濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) で示し、この値が低くなるに従って、LPS の抗原特異性あるいは各 LPS 間の交叉反応原性が高くなることを意味する。

### 2-1. 全菌抗血清を用いた溶血系に対する受身溶血阻止反応

全菌抗血清を用いて行った PHI 反応の結果を Table 12 に示した。O1 コレラ菌に関する PHI 反応において、Ogawa LPS は homologous な Ogawa の溶血系 (Ogawa LPS 感作 SRBC/抗 Ogawa 抗血清) と heterologous な Inaba の溶血系 (Inaba LPS 感作 SRBC/抗 Inaba 抗血清) に対して高い溶血阻止活性を示した [50% 溶血阻止濃度:  $0.19 \mu\text{g/ml}$ ,  $0.65 \mu\text{g/ml}$ ]。一方、Ogawa 因子 B を持たない Inaba LPS は、Ogawa の系において溶血阻止活性を示さず [ $730 \mu\text{g/ml}$ ]、Inaba の homologous な溶血系においてのみ阻止活性を示した [ $0.18 \mu\text{g/ml}$ ] (Table 12)。この結果は、Fig. 1 に示した O1 コレラ菌の O-抗原因子に関する A・B・C concept と良く一致していた。

また、Table 12 に示したように、Ogawa LPS と Inaba LPS は、1875 Original (1875 Original LPS 感作 SRBC/抗 1875 Original 抗血清), 1875 Variant (1875 Variant LPS 感作 SRBC/抗 1875 Variant 抗血清), Kobe 株 (Kobe W-LPS 感作 SRBC/抗 Kobe 抗血清) および Hakata 株 (Hakata P-LPS 感作 SRBC/抗 Hakata 抗血清) の各溶血系に対し、全く溶血阻止活性を示さなかった。1875 Variant LPS と Hakata P-LPS は、O1 コレラ菌の 2 つの溶血系 (Ogawa LPS 感作 SRBC/抗 Ogawa 抗血清, Inaba LPS 感作 SRBC/抗 Inaba 抗血清) に対し溶血阻止活性を示さなかったが、1875 Original LPS は Ogawa の溶血系において、また、Kobe W-LPS は

Table 12. 50% inhibition doses (ID<sub>50</sub>) of LPS isolated from V. cholerae, Vibrio bio-serogroup 1875, V. fluvialis 181-86 Kobe and V. enterocolitica 09 for passive hemolysis system (µg/ml)

Passive hemolysis system (SRBC sensitized with LPS / antiserum)								
	01 <u>V. cholerae</u>		Bio-serogroup 1875		Kobe W-LPS / 181-86 Kobe	Hakata P-LPS/ Hakata	<u>V. enterocolitica</u> 09/ <u>V. enterocolitica</u> 09	<u>tox</u> 101-TI-N4/ <u>tox</u> 101-TI-N4
	NIH 41 / NIH 41	569B / 569B	Original / Original	Variant / Varinat				
01 <u>V. cholerae</u>								
NIH 41 Ogawa	[0.19]	0.65	-	-	-	-	-	500
569B Inaba	730	[0.18]	-	-	931	-	650	1.50
<u>Vibrio</u> bio-serogroup 1876								
Original	0.09	280	[0.03]	1.60	6.98	-	670	43.5
Varinat	24.0	220	6.80	[0.03]	0.02	-	420	25.1
<u>V. fluvialis</u> 181-86 Kobe								
water phase	_a)	0.48	-	0.02	[0.06]	-	-	-
<u>V. cholerae</u> bio-serogroup Hakata								
phenol phase	-	-	-	0.18	1.75	[0.06]	-	-
<u>V. enterocolitica</u> 09	-	-	-	-	-	-	[0.03]	-
<u>tox</u> 101-TI-N4	-	-	-	-	-	-	-	[0.54]

a) more than 1000 µg/ml.

Inaba の溶血系に対してそれぞれ高い溶血阻止活性を示し [0.05  $\mu\text{g/ml}$ , 0.48  $\mu\text{g/ml}$ ]、Ogawa LPS と 1875 LPS 間 および Kobe W-LPS と Inaba LPS 間に抗原的な半交叉反応性が認められた (Table 12)。

1875 Original LPS は、homologous な 1875 Original の溶血系において高い溶血阻止活性 [0.01  $\mu\text{g/ml}$ ] を示したほか、heterologous な 1875 Variant および Kobe 株の両溶血系に対しても弱い溶血阻止能を持っていた [1.60  $\mu\text{g/ml}$ , 6.98  $\mu\text{g/ml}$ ] (Table 12)。Kobe 株と同一の O-抗原因子を持つ 1875 Variant の LPS は、1875 Variant および Kobe 株の溶血系に対し高い溶血阻止活性を示した [0.03  $\mu\text{g/ml}$ , 0.02  $\mu\text{g/ml}$ ]。逆に、Kobe W-LPS は、Kobe 株 および 1875 Variant の両溶血系において高い溶血阻止能を示し [0.06  $\mu\text{g/ml}$ , 0.02  $\mu\text{g/ml}$ ]、1875 Variant LPS と Kobe W-LPS 間には完全な交叉反応性が認められた (Table 12)。

Table 12 に示したように、O1 コレラ菌 LPS, 1875 Original LPS, 1875 Variant LPS および Kobe W-LPS は、Hakata 株の溶血系を阻止しなかった。しかし、Hakata P-LPS は、homologous な Hakata 株の溶血系および heterologous な 1875 Variant の溶血系に対し高い溶血阻止能を示した [0.06  $\mu\text{g/ml}$ , 0.18  $\mu\text{g/ml}$ ]。また、Hakata P-LPS は、Kobe 株の溶血系においても弱い溶血阻止活性を示し、Hakata P-LPS と 1875 Variant LPS 間 および Hakata P-LPS と Kobe W-LPS 間に血清学的半交叉反応性が認められた (Table 12)。

構成成分としてペロサミンを含むが、キノボサミンを含まない Y. enterocolitica O9 LPS (Table 2) は、homologous な Y. enterocolitica O9 の溶血系 (Y. enterocolitica O9 LPS 感作 SRBC/抗 Y. enterocolitica O9 抗血清) においてのみ溶血阻止活性を示し [0.03  $\mu\text{g/ml}$ ]、他の全ての溶血系を阻止しなかった (Table 12)。また、Y. enterocolitica O9 LPS 以外の LPS は、Y. enterocolitica O9 の溶血系に対し全く阻止活性を示さず、Y. enterocolitica O9 LPS と 他の LPS 間には、交叉反応性は認められなかった。キノボサミンを含むが、ペロサミンを含まない O1 コレラ菌 569B Inaba の hypo-toxinogenic mutant [51]

(tox 101-TI-N4) LPS [52] (Table 2) も、*Y. enterocolitica* O9 LPS の場合と同様に、homologous な系においてのみ溶血阻止能を示し、他の heterologous な溶血系に対し阻止活性を示さなかった (Table 12)。また、tox 101-TI-N4 の溶血系 (tox 101-TI-N4 感作 SRBC/抗 tox 101-TI-N4 抗血清) においては、Inaba LPS が弱い溶血阻止活性を示したが、他の LPS は顕著な阻止能を示さなかった (Table 12)。

受身溶血反応における交叉反応原性は、その原理上、試験に供する LPS 間に 1 つ以上の共通抗原因子が存在すれば出現する [48]。一方、受身溶血阻止反応では、LPS の抗原構造が同一か、あるいは非常に類似していない限り交叉反応原性は認められない [48]。また、LPS が複数の抗原因子を持つ場合、例外として交叉反応原性を示すことがある。例えば、抗原因子 A・B・(c) の Ogawa LPS が、抗原因子 A・C の Inaba の溶血系に対して阻止活性を示すように、インヒビターとして用いる LPS が、溶血系を構成する全ての抗原因子を持つ場合には交叉反応原性が認められる。本受身溶血阻止反応において、同一の O-抗原因子を持つ 1875 Variant と Kobe W-LPS の LPS 間には、1875 Variant LPS が Kobe 株の溶血系に対して阻止活性を示し、逆に、Kobe W-LPS が 1875 Variant の溶血系を阻止するという完全な血清学的交叉反応原性が認められたが、抗原因子が若干異なる他の LPS 間には前記のような完全な交叉反応原性は認められなかった (Table 12)。O1 コレラ菌の 2 つの溶血系において、A・B・(c) 因子を持つ Ogawa LPS と A・C 因子を持つ Inaba LPS は、O1 コレラ菌の O-抗原因子に関する A・B・C concept と一致した交叉反応原性を示した。また、これに類似した交叉反応原性が、B・(c)・D・E 因子を持つ 1875 Original LPS と C・D・E 因子を持つ 1875 Variant LPS 間 および 1875 Original LPS と Kobe W-LPS [C・D・E] 間にも若干認められた (Table 12)。

## 2-2. 因子血清を用いた溶血系に対する受身溶血阻止反応

各菌株の LPS 感作 SRBC と各因子血清を組合せて作製した各抗原因子

Table 13. 50% inhibition doses (ID<sub>50</sub>) of LPS isolated from V. cholerae, Vibrio bio-serogroup 1875, V. fluvialis 181-86 Kobe and Y. enterocolitica 09 for passive hemolysis system (ug/ml)

Inhibitor LPS	Passive hemolysis system (SRBC sensitized with LPS / anti-factor serum)											
	NIH41/ anti-A	569B / anti-A	NIH41/ anti-B	Original/ anti-B	Original/ anti-D-E	Variant/ anti-D-E	Kobe W/ anti-D-E	Hakata P/ anti-D-E	Original/ anti-E	Variant/ anti-E	Kobe W/ anti-E	Hakata P/ anti-F
01 <u>V. cholerae</u>												
NIH 41 (Ogawa)	0.37	0.16	0.11	0.19	-	-	-	-	-	-	-	-
569B (Inaba)	0.20	0.10	318	675	-	-	-	-	-	-	-	-
Bio-serogroup 1875												
Original	38.8	23.5	0.03	0.02	0.01	0.02	0.03	0.58	0.03	0.04	0.05	-
Variant	385	285	135	61.3	0.02	0.02	0.02	0.07	0.03	0.02	0.03	-
<u>V. fluvialis</u> (Kobe)												
water phase LPS	a)	-	-	-	0.02	0.03	0.04	0.07	0.05	0.03	0.05	-
Hakata 487-85												
phenol phase LPS	-	-	-	-	-	-	-	0.38	-	-	-	0.80
<u>Y. enterocolitica</u> 09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a) More than 1000 µg/ml

の溶血系に対する受身溶血阻止 (PHI) 反応の結果を Table 13 に示した。前記の如く、表中の数値は、各溶血系における各インヒビター-LPSの 50% 溶血阻止濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) で示し、この数値が低くなるに従って、LPS の抗原特異性が高くなることを意味する。また、受身溶血反応において、C 因子血清は、O1 コレラ菌 Inaba をはじめ C 因子を持つ各菌株 (Fig. 1) から分離した LPS で感作した SRBC を溶血させなかったことから (Table 11)、C 因子の溶血系は作製できなかった。

Table 13 に示したように、O1 コレラ菌 Ogawa の抗原因子は A・B・(c) であることから、Ogawa LPS は A 因子に関する溶血系および B 因子に関する溶血系において高い溶血阻止活性を示した。同様に、各菌株から分離した LPS は、対応する O-抗原因子 (Fig. 1) に関する溶血系においてのみ溶血阻止活性を示した。すなわち、Table 13 に示したように、Inaba LPS は A 因子に関する溶血系、1875 Original LPS は B, D, D・E および E 因子の各溶血系、1875 Variant LPS と Kobe W-LPS は D, D・E および E 因子の各溶血系および Hakata P-LPS は D および F 因子に関する溶血系においてのみ溶血阻止能が認められた。O1 コレラ菌 Inaba と共通抗原性を持つことが報告されている *Y. enterocolitica* O9 [45] の LPS は、全ての溶血系に対し、阻止活性を示さなかった。Hakata P-LPS は、D・E 因子の溶血系に対し阻止活性を示さなかった (Table 13)。これは、感作抗原である 1875 Original LPS, 1875 Variant および Kobe W-LPS は D 因子 および E 因子を持ち、また、D・E 因子血清は両抗原因子に対する抗体を含んでいるが、Hakata P-LPS は E 因子を持たないためであると思われる。

これらの結果は、各因子血清を用いた受身溶血反応で得られた結果 (Table 11) と同様に、Fig. 1 に示した各 O-抗原因子の抗原決定基が、各菌株由来の LPS 分上に存在することを示している。

### 第 3 節. N-置換基転換による O1 コレラ菌 LPS の血清学的性状の変化

LPS を感作抗原として用いる受身溶血 (PH) 反応において、O1 コレラ

菌 569B (Inaba) LPS と Hakata 株 LPS 間には血清学的交叉反応性が認められるが、O1 コレラ菌 NIH 41 (Ogawa) LPS と Hakata LPS 間には明瞭な交叉反応原性が認められないことはすでに述べた (Fig. 23, 26, Table 10)。前述したように、O1 コレラ菌 LPS と Hakata LPS の O-抗原特異多糖側鎖の主要構造は、非常に類似しており、ペロサミンの N-置換基が異なるのみである。従って、O1 コレラ菌 LPS の O-抗原特異多糖側鎖部位を Hakata 株 LPS のそれへ化学的に部分転換することは可能である。本実験では、前記の方法 (第 1 章・第 7 節) により O1 コレラ菌 Intact LPS から N-deacylated LPS および N-acetylated LPS を調製し、それらの血清学的性状、特に Hakata 株との交叉反応原性を PH 反応により検討した。

### 3-1. 化学修飾 O1 コレラ菌 LPS の糖組成

O1 コレラ菌 NIH 41 (Ogawa) と 569B (Inaba) の LPS、両 LPS を N-脱アシル化することにより調製した O1 コレラ菌 N-deacylated LPS、およびこれを更に N-アセチル化して得た O1 コレラ菌 N-acetylated LPS の糖組成を Table 14 に示した。表中の数値は、各 LPS の L-グリセロ-D-マンノヘプトースの含量を 3 モルとした際の各構成糖のモル比で示した。N-アシル基の相違を明確にするため、酸加水分解後の Dowex (H<sup>+</sup>) イオン交換クロマトグラフィーにおいて、通常の如くアミノ糖画分に分画されるペロサミン (第 1 章・第 7 節) は PerN で示し、また、同クロマトグラフィーにおいて中性糖画分に分画される N-アセチル・ペロサミン (第 1 章・第 7 節) は、Hakata P-LPS の未同定アミノ糖 (AS) と同一の構造を持つことから AS と示した。

Table 14 に示したように、O1 コレラ菌 N-deacylated LPS の糖組成は、見かけ上 intact LPS のそれと同一であり、その PerN 含量に相違は認められなかった。しかし、N-deacylated LPS を N-アセチル化して得た O1 コレラ菌 N-acetylated LPS からは、PerN が L-グリセロ-D-マンノヘプトースに対して 0.4~0.5 モルしか検出されず、その代りとして、



Table 14. Sugar composition of intact and modified LPS isolated from 01 V. cholerae (molar ratio)

	Glc	Fru	Hep	GlcN	PerN	QuiN	AS
NIH 41 (Ogawa) LPS	2.1	2.6	3.0	1.8	3.6	0.3	—
569B (Inaba) LPS	2.0	2.2	3.0	1.8	3.5	0.2	—
NIH 41 N-deacylated LPS	2.3	2.2	3.0	1.6	3.4	0.4	—
569B N-deacylated LPS	2.1	1.9	3.0	1.7	3.8	0.5	—
NIH 41 N-acetylated LPS	2.1	2.2	3.0	1.8	0.4	0.3	3.1
569B N-acetylated LPS	1.9	2.1	3.0	1.8	0.5	0.5	2.7

The data represent the molar ratios of the component sugars found in LPS, the values being calculated on the basis of the assumption that LPS contains 3 moles of L-glycero-D-manno-heptose. Abbreviations: Glc, glucose; Fru, fructose; Hep, L-glycero-D-manno-heptose; GlcN, glucosamine; PerN, perosamine; QuiN, quinovosamine; AS, N-acetyl-perosamine. Glucose, L-glycero-D-manno-heptose and N-acetyl-perosamine (AS) were determined by gas-liquid chromatography (GLC) using program 1 (Table E-5) as alditol acetate derivatives after acid hydrolysis in 2 M-tri-fluoric acid at 120°C for 1 hr. Fructose was determined by GLC using program 1 as O-acetyl-O-methyloxime derivative after acid hydrolysis in 5% acetic acid at 100°C for 2 hr. Glucosamine, perosamine and quinovosamine were determined by GLC using program 2 as N-acetyl-alditol acetate derivatives after acid hydrolysis shown in experimental part. L-glycero-D-manno-heptose was also estimated by the method of Osborn (32).

PerN の減少量に相当する量の N-アセチル・ペロサミン(AS)が検出された。すなわち、O1 コレラ菌 N-acetylated LPS からの PerN と AS の検出比から、intact LPS のペロサミンの N-置換体である 3-deoxy-L-glycero-tetronic acid は、LPS の N-脱アシル化とそれに続く N-アセチル化反応により、約 85~90% の割合で N-アセチル基に転換されていることが明らかになった。

### 3-2. 化学修飾 O1 コレラ菌 LPS の血清学的性状

凝集反応および凝集素吸収試験において、血清学的に Hakata 株と交叉反応原性を持つ O1 コレラ菌 Inaba の LPS, および同 LPS から調製した N-deacylated LPS と N-acetylated LPS で感作した各 SRBC に対する抗 Inaba および抗 Hakata 抗血清の溶血曲線を Fig.30 と Fig. 31 に示した。前記と同様、Fig. 30 と Fig. 31 では、溶血曲線が右へ移動するに従って LPSの抗原特異性あるいは LPS 間の交叉反応原性が高くなることを意味する。O1 コレラ菌 Inaba LPS/抗 Inaba 抗血清の homologous な溶血系 (Fig.30)において、抗 Inaba 抗血清は Inaba LPS 感作 SRBC に対し 22,300 倍の高い 50% 溶血価を示したが、Inaba N-deacylated LPS には O1 コレラ菌 LPS 抗原特異性の著しい低下が認められ、同 LPS 感作 SRBC に対する 50% 溶血価は 370 倍であった。しかし、Inaba N-acetylated LPS 感作 SRBCに対する抗 Inaba 抗血清の 50% 溶血価は 4,500 倍であった。すなわち、N-脱アシル化により消失した O1 コレラ菌 Inaba LPS の抗原特異性は、N-アセチル基の導入により、その一部が復元することが明らかになった。

O1 コレラ菌 Inaba LPS/抗 Hakata 抗血清の heterologous な溶血系 (Fig. 31)においても同様な傾向が見られた。すなわち、Fig. 31 に示したように、Inaba LPS 感作 SRBC に対し抗 Hakata 抗血清は 5,100 倍の 50% 溶血価を示したが、Inaba N-deacylated LPS 感作 SRBC に対する 50% 溶血価は 570 倍であり、N-脱アシル化することによって Inaba LPS と Hakata LPS 間の交叉反応原性は著しく低下した。しかし、N-acety-

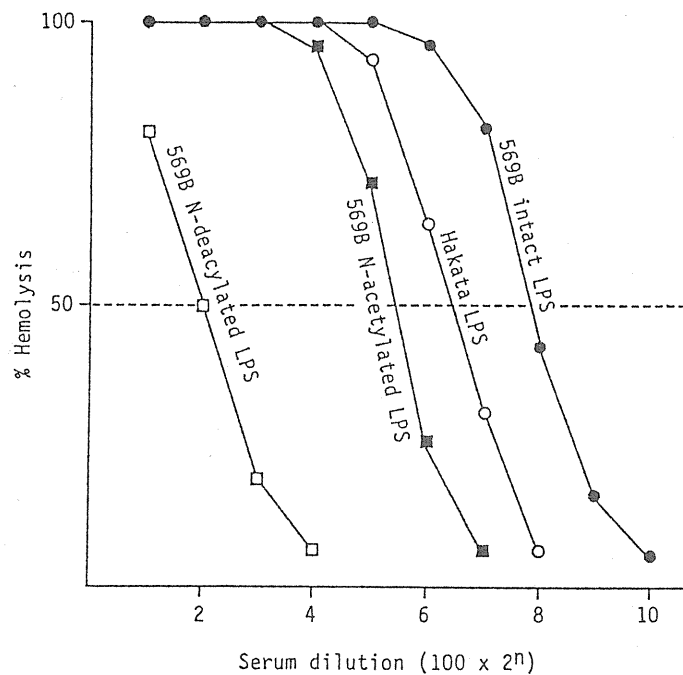


Fig. 30. Passive hemolysis of SRBC sensitized with intact and modified LPS of *V. cholerae* 569B (Inaba) by antiserum against *V. cholerae* 569B (Inaba).

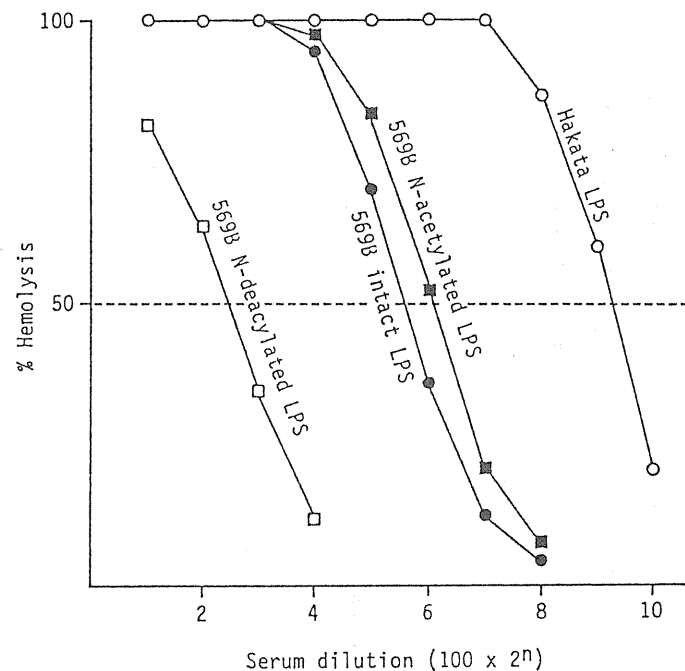


Fig. 31. Passive hemolysis of SRBC sensitized with intact and modified LPS of *V. cholerae* 569B (Inaba) by antiserum against *V. cholerae* bio-serogroup Hakata.

lated LPS 感作 SRBC に対する抗 Hakata 抗血清の 50% 溶血価は Inaba LPS 感作 SRBC に対するそれより高く (6,800 倍)、Inaba LPS と Hakata LPS 間の血清学的交叉反応原性は Inaba N-deacylated LPS を N-アセチル化することにより完全に復元した。

Fig. 32 と Fig. 33 に、O1 コレラ菌 Ogawa LPS, N-deacylated LPS および N-acetylated LPS で感作した各 SRBC に対する抗 Ogawa および抗 Hakata 抗血清の溶血曲線を示した。前記と同様、Fig. 32 と Fig. 33 でも、溶血曲線が右へ移動するに従って LPS の抗原特異性あるいは LPS 間の交叉反応原が高くなることを意味する。Fig. 32 に示したように、O1 コレラ菌 Ogawa LPS/抗 Ogawa 抗血清の homologous な溶血系において、抗 Ogawa 抗血清は、Ogawa LPS 感作 SRBC に対し 10,040 倍の高い 50% 溶血価を示した。また、Ogawa N-deacylated LPS 感作 SRBC に対する抗 Ogawa 抗血清の 50% 溶血価は 1,730 倍であり、Inaba の場合 (Fig. 30) と同様に、LPS の N-脱アシル化により OgawaLPS の O-抗原特異性は著しく低下することが認められた。しかし、Ogawa N-acetylated LPS 感作 SRBC に対する抗 Ogawa 抗血清の 50% 溶血価は、2,100 倍であり、Ogawa N-deacylated LPS 感作 SRBC に対するそれと比較してわずかに増加したにすぎず、Inaba N-deacylated LPS の N-アセチル化により認められた O1 抗原特異性の復元 (Fig. 30)は、Ogawa の場合にはほとんど観察されなかった (Fig. 32)。

Table 10 に示したように、Ogawa LPS 感作 SRBC は抗 Hakata 抗血清で溶血せず (50% 溶血価: 430 倍)、Ogawa LPS/抗 Hakata 抗血清の heterologous な溶血系 (Fig. 33)において、Ogawa LPS と Hakata 株 LPS 間に血清学的交叉反応原性は認められなかった。同様に 抗 Hakata 抗血清は、Ogawa N-deacylated LPS を抗原として認識せず、同 LPS 感作 SRBC に対し溶血活性を示さなかった (50% 溶血価: 510 倍)。しかし、Fig. 33 に示したように、抗 Hakata 抗血清は、Ogawa N-acetylated LPS 感作 SRBC を高い titer で溶血し (50% 溶血価: 8,200 倍)、Ogawa LPS の N-置換基をアセチル基に転換することにより Ogawa LPS と Hakata 株 LPS 間に新しい血清学的交叉反応原性が発現した。

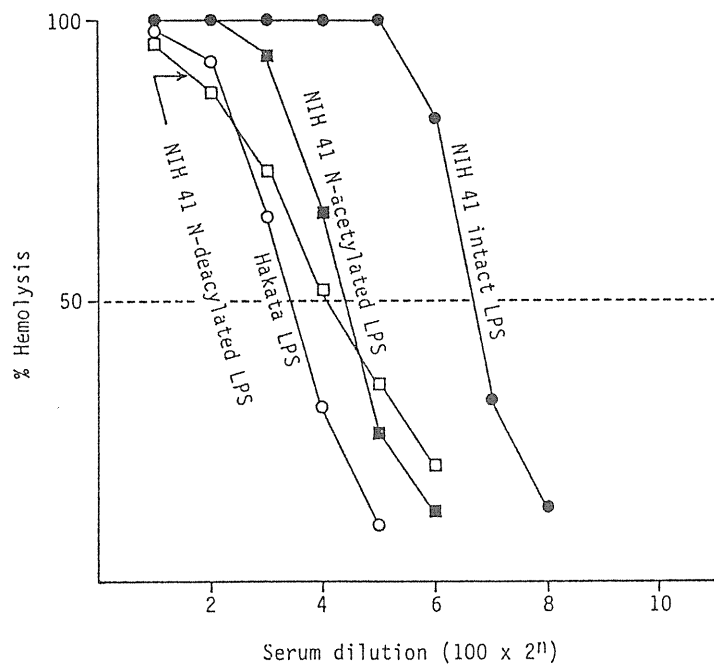


Fig. 32. Passive hemolysis of SRBC sensitized with intact and modified LPS of *V. cholerae* NIH 41 (Ogawa) by antiserum against *V. cholerae* NIH 41 (Ogawa).

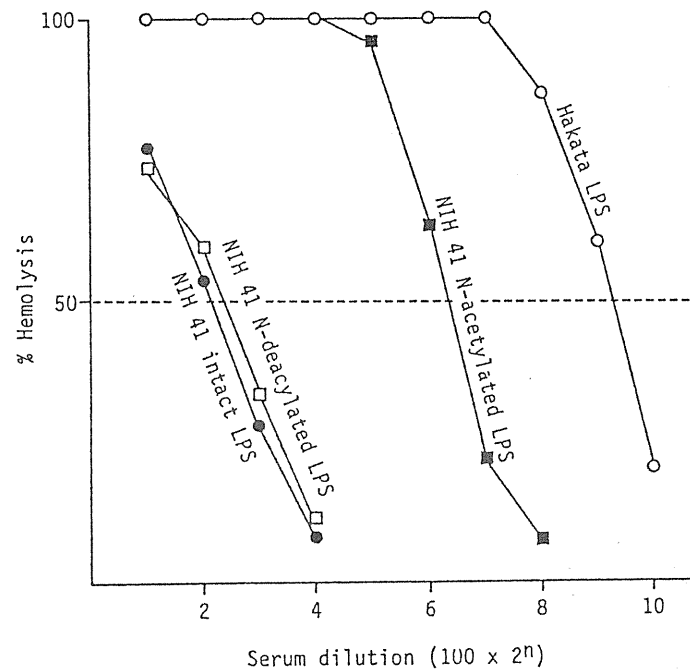


Fig. 33. Passive hemolysis of SRBC sensitized with intact and modified LPS of *V. cholerae* NIH41 (Ogawa) by antiserum against *V. cholerae* bio-serogroup Hakata.

以上、O1 コレラ菌 Inaba LPS が持つ抗原特異性と、その Hakata 株 LPS との交叉反応原性は、LPS を N-脱アシル化することにより完全に消失し、これを更に N-アセチル化することにより復元した (Fig. 30, 31)。また、LPS の N-脱アシル化に伴う抗原特異性の消失は Ogawa の場合にも観察された (Fig. 32)。Intact な Ogawa LPS を感作抗原として用いた受身溶血反応においては Ogawa LPS と Hakata 株 LPS 間に血清学的交叉反応原性は認められなかったが、Ogawa LPS の N-置換基をアセチル基に転換すると、両者間に明瞭な交叉反応原性が発現した。これらの結果は、O1 コレラ菌 LPS が持っている抗原特異性、およびその Hakata 株 LPS との交叉反応原性の発現には、LPS O-抗原特異多糖側鎖の N-置換基が密接に関与していることを示すと共に、本研究の第 1 章・第 7 節で得られた "Hakata LPS の O-抗原特異多糖側鎖に N-アセチル・ペロサミンの homopolymer が存在する" という成績を血清学的立場から支持している。

## [考 察]

本章では、O1 コレラ菌および O1コレラ菌と共通抗原性を持つ 1875 株, Kobe 株 および Hakata 株から分離・精製した LPS の血清学的性状を検討した。また、化学修飾した O1 コレラ菌 LPS の血清学的性状を検討し、O1 コレラ菌 LPS の抗原特異性決定部位の解明を試みた。

一般に、グラム陰性細菌の O-抗原性を決定する因子は、細胞壁外膜に局在する LPS であることが知られてる[10]。各菌株の LPS, 全菌抗血清および因子血清を用いた受身溶血反応と受身溶血阻止反応では、同一 O-抗原式を持つ 1875 Variant と Kobe 株から分離した両 LPS 間に完全な血清学的交叉反応原性が認められるなど、各菌株の O-凝集性 (Fig. 1) を反映する結果が得られたことから、各菌株の O-抗原因子 (Fig. 1) は LPS により決定されるものと思われる。

O1 コレラ菌 LPS の O-抗原特異多糖側鎖部位は、3-deoxy-L-glycero-tetronic acid で N-アシル化されたペロサミンの linear  $\alpha(1\rightarrow2)$  linked homopolymer とキノボサミンから構成されていることはすでに述べた。しかし、O1 コレラ菌 LPS の抗原特異性決定部位の解明は、未だに成されていない。本研究において、O1 コレラ菌の intact LPS と化学修飾した LPS の抗原性を受身溶血反応により検討した結果、O1 コレラ菌 LPS が持つ抗原特異性は、LPS O-抗原特異多糖側鎖部位の主要部分を構成するペロサミン・ホモポリマーの N-アシル基である 3-deoxy-L-glycero-tetronic acid を除去することによって消失することが認められた。また、LPS の N-脱アシル化によって消失した Inaba LPS の抗原特異性は、N-脱アシル化した LPS を N-アセチル化することにより一部復元したが、同操作による Ogawa LPS の抗原特異性の復元はほとんど認められなかった。これらの結果は、O1 コレラ菌 LPS が持つ抗原特異性 (A・B・C) の発現には、LPS O-抗原特異多糖側鎖部位の N-置換基が密接に関与していることを示している。すなわち、O1 コレラ菌 LPS の各抗原因子 (A・B・C) に対する抗体は、LPS O-抗原特異多糖側鎖の N-置換基自体の構造、あるいは N-置換基を含めた糖成分の全体構造を認識しているも

のと思われる。

O1 コレラ菌 LPS の O-抗原特異多糖側鎖は、第 1 章で述べたの  
うに、ペロサミンとキノボサミンにより構成されており、ペロサミンの  
4 位のアミノ基は 3-deoxy-L-glycero-tetronic acid によってアシル化  
されている。しかし、キノボサミンもアミノ糖であることから、N-アシ  
ル化されていることが予想されるが、その N-置換基の種類は不明であり、  
現在、この同定を急いでいる。また、Inaba N-deacylated LPS を N-ア  
セチル化することにより復元した抗原因子は、Inaba と Ogawa の O-抗  
原構造[Inaba: A・C, Ogawa: A・B・(c)]から考えて、恐らく Inaba 因子 C  
と思われる。すなわち、O1 コレラ菌の抗原因子のうち、A および B 因  
子の発現には 3-deoxy-L-glycero-tetronic acid の存在が必須であるが、  
C 因子はその種類に係わらず N-アシル基が存在すれば発現する可能性が  
示された。

一方、O1 コレラ菌 Inaba LPS と Hakata 株 LPS 間の血清学的交叉  
反応原性も、Inaba LPS を N-脱アシル化することにより消失し、N-アセ  
チル化することによって完全に復元した。また、O1 コレラ菌 Ogawa in-  
tact LPS と Hakata 株 LPS 間には交叉反応原性は認められなかったが、  
Ogawa LPS を N-脱アシル化した後 N-アセチル化すると、両 LPS 間に明  
瞭な血清学的交叉反応原性が出現した。これらの結果から、O1 コレラ  
菌 LPS と Hakata 株 LPS 間の血清学的交叉反応原性の発現にも、O-抗  
原多糖側鎖部分の N-置換基が重要な役割を演じていると思われる。



## [総 括]

本研究では、O1 コレラ菌と共通抗原性を持つ 3 種の non-cholera vibrio, *Vibrio* bio-serogroup 1875, *V. fluvialis* 181-86 Kobe および *V. cholerae* bio-serogroup Hakata から分離・精製した LPS の化学的・血清学的性状を追究し、これらの LPS と O1 コレラ菌 LPS との関連性について検討した。また、化学修飾した O1 コレラ菌 LPS の血清学的性状を検討し、O1 コレラ菌 LPS の抗原特異性決定部位の解明を試みた。さらに、我国で分離された 31株の *V. cholerae* bio-serogroup Hakata について、LPS 多糖部の糖組成に基づく化学分類を行い、本菌と O1 コレラ菌との判別を試みた。

LPS, 全菌抗血清および因子血清を用いた受身溶血および受身溶血阻止反応により、各菌株がもつ O-抗原因子は、その LPS 分子上に存在することが示された。

他の多くのグラム陰性細菌の場合と異なり、*Vibrio* bio-serogroup 1875, *V. fluvialis* および *V. cholerae* bio-serogroup Hakata からの LPS の抽出性状には大きな特徴が見られ、特に、Kobe と Hakata からは抗原性が異なる 2 種類の LPS (S 型 LPS と R 型 LPS) が得られた。これらの菌株の S 型 LPS は、O1 コレラ菌の特異的糖成分であるペロサミンとキノボサミンを含んでいた。また、degradation study の結果、この 2 つの糖質は、各 LPS の O-抗原特異多糖側鎖部分に存在することが明らかになった。これらの LPS と O1 コレラ菌 LPS の O-抗原特異多糖側鎖部分に共通に含まれる糖成分は、ペロサミンとキノボサミンのみであることから、この 2 の糖成分が O1 コレラ菌と non-cholera vibrio の共通抗原である B 因子と C 因子に抗原的に関連していることが示唆された。また、1875 株 LPS, Kobe W-LPS に含まれていた未同定物質 (NS I, NS II)、Hakata P-LPS に見出された未同定アミノ糖 (AS)、およびこれらの各 LPS に含まれていたマンノースも、各 LPS の O-抗原特異多糖側鎖部位に存在することが明らかになった。各菌株の O-抗原式 (Fig. 1) と各 LPS におけるこれらの糖成分の分布パターンから、3 種

の non-cholera vibrio の LPS に共通に含まれるマンノースは、これら 3 菌株の共通抗原因子である D に、1875 株 LPS と Kobe W-LPS に見出された未同定物質(NS I, NS II)は、両者の共通抗原である E にそれぞれ相当し、また、Hakata P-LPS のみに含まれていた未同定アミノ糖(AS)は、Hakata 株独自の抗原因子である F に対応することが示唆された。O1 コレラ菌 LPS の常成分であるフルクトースは、コレラ菌の O1 特異性には関与していないことが明らかになった。O1 コレラ菌 LPS のコア部分は、主に、グルコースと L-グリセロ-D-マンノヘプトースから成るが、1875 株 LPS, Kobe 株 LPS および Hakata 株 LPS の各コア部分は、その他の構成糖として、グルコサミン, D-グリセロ-D-マンノヘプトースとウロン酸, およびガラクトースをそれぞれ含み、これら 4 菌株の LPS コア部分は、各々異なった構造を持つことが明らかになった。

Vibrio bio-serogroup 1875, V. fluvialis 181-86 Kobe および V. cholerae bio-serogroup Hakata の各 LPS に含まれる過ヨウ素酸・チオバピツール酸反応陽性物質(X)は、高圧濾紙電気泳動実験および GC/MS 分析により、KDO のリン酸化誘導体であることが示された。また、各菌株の LPS の多糖体部分とリピド A 部分とを連結する物質は 4-O-phosphoryl KDO であることが示唆された。

GLC, GC/MS 分析および NMR 解析により、Hakata P-LPS に含まれる未同定アミノ糖(AS)は、N-アセチル・ペロサミンであることが明らかになった。また、Hakata P-LPS の O-抗原特異多糖側鎖は、主に、 $\alpha(1\rightarrow2)$  結合した N-アセチル・ペロサミンの linear homopolymer により構成されていることが明らかになった。この結果は、血清学的にも証明された。

我国において分離された 31 株の V. cholerae bio-serogroup Hakata は、LPS 多糖部の糖組成に基礎を置く化学分類法により 2 つのグループに分類できた。また、V. cholerae bio-serogroup Hakata は、本化学分類法によって O1 コレラ菌とは明らかに異なる化学型に分類できた。

O1 コレラ菌 LPS, N-deacylated LPS および N-acetylated LPS の抗原特異性を受身溶血反応により検討した結果、O1 コレラ菌が持っている抗原特異性、および O1 コレラ菌 LPS と Hakata 株 LPS 間の血清学

的交叉反応性の発現には、LPS O-抗原特異多糖側鎖部分の N-置換基が密接に関与していることが明らかになった。また、O1 コレラ菌 LPS の N-脱アシル化により消失した O1 抗原因子(A・B・C)のうち、Inaba 因子 C は、LPSに N-アセチル基を導入することによって復元することが認められた。

以上、本研究により、O1 コレラ菌と共通抗原性を持つ 3 種の non-cholera vibrio の LPS に関する化学的・血清学的性状が明らかにされた。V. cholerae bio-serogroup Hakata と O1 コレラ菌は、久恒ら [56,57] が開発した化学分類法により明確に区別され、分類学上、V. cholerae bio-serogroup Hakata は non-O1 グループ・コレラ菌として取り扱うのが妥当である。また、O1 コレラ菌の抗原因子のうち、A および B 因子の発現には 3-deoxy-L-glycero-tetronic acid の存在が必須であるが、C 因子はその種類に係わらず N-アシル基が存在すれば発現する可能性が示された。しかし、依然として、O1 コレラ菌の 2 つの血清型 (Ogawa と Inaba) を決定する LPS の血清学的抗原特異性決定部位の化学構造は不明である。今後、本研究で得られた知見を基礎として、この問題を解明することが大きな課題となると考えられる。

## [謝 辞]

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました 恩師 城西大学久恒和仁 教授に衷心より感謝致します。

貴重な菌株と因子血清を御分与して戴いた 国立予防衛生研究所 島田俊雄 博士、坂崎利一 博士 並びに 大阪検疫所 阿部久夫 衛生課長に深謝致します。

また、数々の有益な御助言と御指導を賜りました 城西大学 野崎祐勝 助教授、近藤誠一 助手、井口毅裕 助手 に心より感謝するとともに、実験に際し、終始御協力を頂いた城西大学薬学部微生物学教室の諸氏に感謝致します。KDO の化学分析に際し、御協力を頂いた Dr. Ernst Th. Rietschel、Dr. Uli Zähringer (Forschungsinstitut Borstel, West Germany) に深謝致します。

NMR スペクトルの測定と GC/MS 分析を施行せられた城西大学機器センターの諸氏に感謝致します。

本論文の作成にあたり、御校閲と御教示を賜りました 副査 城西大学 森田 豊 教授、副査 城西大学 倉田宗司 教授、副査 城西大学 斉藤節生 助教授に深く感謝致します。

## 実験の部

## [実験の部]

### 一般事項

#### 1. 使用菌株

本研究に使用した菌株とその由来、培養温度および使用培地を Table E-1 に示した。各菌株は至適条件で 16 時間ジャーファメンターで培養し、120°C・20 分間加熱殺菌した後、連続遠心分離により集菌した。得られた各菌体は蒸留水で 3 回洗浄したのち、アセトン乾燥し、下記の方法により LPS を抽出した。各アセトン乾燥菌体の収率を Table E-2 に示した。

Table E-1 使用菌株と培養条件

菌 株	由来	温度	培 地
<u>Vibrio bio-serogroup</u>			
1875 Original	1	28°C	3% 食塩添加普通ブイヨン (pH7.2)
1875 Variant	1	28°C	3% 食塩添加普通ブイヨン (pH7.2)
<u>Vibrio fluvialis</u>			
181-86 Kobe	1	28°C	1.5% 食塩添加普通ブイヨン (pH7.2)
<u>Vibrio cholerae bio-</u>			
serogroup Hakata	1,2	37°C	普通ブイヨン (pH7.8)
<u>Yersinia</u>			
<u>enterocolitica</u> O9	3	37°C	ハートインフュージョン (pH7.2)
<u>Bordetella pertussis</u>			
phase I	4		

1) 島田俊雄・坂崎利一両博士 (国立予防衛生研究所・東京)。2) 阿部久夫衛生課長 (大阪検疫所)。3) 緒方幸雄教授 (杏林大学医学部微生物学教室)。4) 大友信也博士 (化学および血清療法研究所・熊本) から培養菌体を分与された。

Table E-2. 菌体収率

菌 株	収 率 (アセトン乾燥菌体/培養液)
<u>Vibrio</u> bio-serogroup	
1875 Original	1.2 g/l
1875 Variant	0.9 g/l
<u>Vibrio</u> fluvialis	
181-86 Kobe	1.5 g/l
<u>Vibrio</u> cholerae	
bio-serogroup Hakata	1.8 g/l

## 2. LPS の調製

アセトン乾燥菌体からの LPS の分離・精製は、下記のように Galanos らのフェノール・クロロホルム・石油エーテル (PCP) 法 [20] と Westphal らのフェノール・水法 [21] により行った。

### 2-1. フェノール・クロロホルム・石油エーテル法

アセトン乾燥菌体 50 g を 200 ml のフェノール・クロロホルム・石油エーテル (PCP) 混液 (2:5:8, v/v/v) に懸濁させ、室温にて 5 分間超音波処理した。本懸濁液を遠心分離 (15,000 x g, 10 分) し、上清を分取した後、沈渣である菌体に再び 200 ml の PCP 混液を加えて良く懸濁させ、上述と同じ抽出操作を 2 回繰返した。得られた上清を減圧下 30~40°C にて濃縮することによりクロロホルムと石油エーテルを除去し、フェノール層のみを分取した。本フェノール層に沈澱が生じるまで蒸留水を加えた後、遠心分離 (15,000 x g, 10 分) し、得られた沈澱を 80% フェノールで 3 回、ジエチルエーテルで 3 回洗浄後乾燥し、これを粗 LPS とした。粗 LPS を超遠心分離の反復 (105,000 x g, 3 時間, 6回) と RNase 処理 [22] (20  $\mu$ g/ml in 25 mM Tris-HCl buffer [pH 7.4], 37°C, 3 時間) により

精製した後、凍結乾燥して精製 LPS を得た。また、PCP 抽出を行った後の菌体は、再びアセトン乾燥し、更にフェノール・水抽出を行った。

PCP 抽出により、*V. fluvialis* 181-86 Kobe からは LPS が分離されたが、他の菌株から LPS は抽出されなかった。また、*Vibrio* bio-sero-group 1875 からは、本抽出法により、未知物質(non-LPS materials, NL)が得られた。LPS および NL の菌体からの収率を Table E-3 に示した。

Table E-3. アセトン乾燥菌体からの LPS 収率(% , w/w)

菌 株	PCP 抽出	フェノール・水抽出	
		水層由来	フェノール層由来
Kobe 株	PCP-LPS (0.4)	W-LPS (0.6)	—
Hakata 株	—	W-LPS (3.5)	P-LPS (2.4)
1875 Original	NL	LPS (0.5)	—
Variant	NL	LPS (0.5)	—

PCP-LPS; PCP 抽出により得られた LPS. W-LPS; フェノール・水抽出の水層から得られた LPS. P-LPS; フェノール・水抽出のフェノール層から得られた LPS. NL; 未知物質(non-LPS materials).

## 2-2. フェノール・水法

PCP 抽出後のアセトン乾燥菌体 30 g を 1.2 l の 45% フェノールに懸濁させた後、65~68°C にて 15 分間激しく振盪・抽出した。本懸濁液を 4°C に冷却した後、水層、フェノール層、菌層に分離するため遠心分離(15,000 x g, 20 分)した。水層を分取した後、得られた水層と等容量の蒸留水を遠心残渣であるフェノール層と菌層に加え、更に上述と同じ抽出操作を 2 回行った。最後の抽出の際には、水層の他にフェノール層も分取した。得られた水層とフェノール層を一夜透析した後、その内液を遠心分離(15,000 x g, 10 分)し不溶物を除去した後、減圧下にて約 100 ml まで濃縮した。各濃縮液を超遠心分離(105,000x g, 3 時間)し、得られ



た沈澱を粗 LPS とした。粗 LPS を PCP 抽出法の場合と同様、超遠心分離の反復と RNase 処理により精製した後、凍結乾燥して精製 LPS を得た。各菌株からの LPS 収率を Table E-3 に示した。

PCP 抽出およびフェノール・水抽出により得られた LPS は、下記の各実験に供した。

## 第 1 章に関する実験

### 1. Degraded polysaccharide (DPS) 画分の調製

LPS の多糖体画分である Degraded polysaccharide (DPS)画分は、Galanos らの方法[23]に基づき、LPS を 5% 酢酸(10 mg/ml)で 100°C、2~5 時間加水分解後遠心分離し、その可溶性画分を減圧下に蒸発乾固して調製した。また、遠心沈渣は蒸留水で 3回洗浄した後、凍結乾燥してリピド A画分とした。

Table E-4. DPS の Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーにより得られた各フラクションの収率と LPS から分離したリピド A の収率(%、w/w)

各 LPS から 得た DPS	Fraction					リピド A
	II	A	B	III	IV	
1875 Original-DPS	47.3	—	—	5.9	6.9	14.1
Variant-DPS	51.1	—	—	4.5	7.0	15.6
Kobe W-DPS	41.2	—	—	6.7	9.8	20.9
PCP-DPS	—	—	—	22.7	14.4	45.9
Hakata P-DPS	41.4	—	—	5.8	7.7	24.7
W-DPS	—	3.6	3.2	26.4	9.5	39.4

得られた DPS 画分は、10 ml のピリジン・酢酸・水(10:4:1000, v/v/v)に溶解し、遠心分離により不溶物を除去した後、Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィー(後述)に供した。DPS の Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーにより得られた各フラクション (Frc.)の収率と LPS から分離したリピド A の収率を Table E-4 に示した。これらの各 Frc. は、下記の化学分析に供した。

## 2. 化学分析法

LPS およびその他の試料に含まれる中性糖， アミノ糖および脂肪酸の分析は、下記のようにガスクロマトグラフィー (GLC)，ガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)および呈色反応等により行った。

### 2-1. 中性糖の分析

LPS およびその他の試料 3~5 mg を 1 ml の 2 M-トリフルオール酢酸で 120°C, 1 時間加水分解した後、窒素気流下にて蒸発乾固した。残渣を 2 ml の 0.01 M-塩酸に溶解し、Dowex 50 (H<sup>+</sup>) カラムを通過させた後、20 ml の蒸留水で溶出して中性糖画分を分取した。本中性糖画分を減圧下 50°C で蒸発乾固させ、Laine らの方法[24]に従って、水素化ホウ素ナトリウム(100 mg-NaBH<sub>4</sub> /3 ml-H<sub>2</sub>O, 0.6 ml)で還元(室温, 3 時間)した後、完全アセチル化(無水酢酸 1 ml, 100°C, 2 時間)してアルジトール・アセテート誘導体を調製し、Table E-5に示したプログラム 1 を用いる GLC および GC/MS 分析により定性・定量した。内部標準物質としてキシロースを用いた。また、弱酸処理により簡単に LPS から遊離するフルクトースの分析は下記のように行った。試料 3~5 mgを 1 ml の 5%-酢酸で 100 °C, 2 時間加水分解後、上述と同じ方法によって分取した中性糖画分を、還元せずに Mawhinney らの方法[25]に従い 2-O-メチルオキシム化(オキシム化試薬 0.1 ml, 70°C, 15 分)した後、ピリジン・無水酢酸 (1:3, v/v, 1 ml) で 70°C, 25 分アセチル化して O-アセチル-2-O-メチルオキシ

ム誘導体を調製し、上記と同じ条件で GLC および GC/MS 分析により定性・定量した。オキシム化試薬は、300 mg の塩酸 O-メチルヒドロキシルアミンをメタノール(1 ml)とピリジン (1.78 ml) の混液に溶解させた後、0.22 ml の 1-ジメチルアミノ-2-プロパノールを加えて作成した。

1875 Original LPS, Variant LPS および Kobe W-LPS に含まれていた 2 つの未同定中性糖(NS I, II)の定量は、試料 3~5 mg を 1 ml の 2 M-トリフルオロ酢酸で 120°C, 1 時間加水分解した後、上記の方法でアルジトール・アセテート誘導体を調製し、Table E-5 に示したプログラム 4 を用いる GLC 分析により行った。

Table E-5. GLC および GC/MS 分析条件

プログラム	カラム	カラム温度	Injection 温度
プログラム 1	3%-ECNSS-M	150~190°C, 2°C/min	250°C
プログラム 2	TABSORB	160~210°C, 2°C/min	250°C
プログラム 3	25%-DEGS	150~210°C, 1°C/min	250°C
プログラム 4	ULBON HA-54	150~230°C, 2°C/min	250°C
プログラム 5	ULBON HA-54	180~300°C, 3°C/min	290°C

3%-ECNSS-M (Support : Uniport HP, 3 mm x 2 m, ガククロ工業). TABSORB (3 mm x 2 m, Regis Chemical Co.). 25%-DEGS (Support: Chromosorb WAW DMCS, 3 mm x 2 m, ガスクロ工業). ULBON HA-54 (0.24 mm x 25 m, クロマトパッキングセンター). キャリアーガス: 窒素. 検出器: 水素炎イオン化型検出器.

## 2-2. アミノ糖の分析

試料 3~5 mg を 1 ml の 4 M-塩酸で 100°C, 8 時間加水分解後、減圧下、ロータリーエバポレーターで蒸発乾固した。残渣を 2 ml の 0.01 M-塩酸に溶解させた後、Wheat の方法[26]に従い、Dowex 50 (H<sup>+</sup>) カラムを通過させ、20 ml の蒸留水で洗浄後、15 ml の 2 M-塩酸で溶出しアミノ糖画分を得た。本画分を減圧下蒸発乾固させた後、Lüderitz らの方法

[27]に従って、2 ml の炭酸水素ナトリウム水溶液中 20  $\mu$ l の無水酢酸で N-アセチル化(室温, 1 時間)した後、中性糖の場合と同様、水素化ホウ素ナトリウムで還元、無水酢酸で完全アセチル化して N-アセチル・アルジトール・アセテート誘導体を調製し、Table E-5 に示したプログラム 2 を用いる GLC および GC/MS 分析によって定性・定量した。また、酸加水分解に対して不安定であるペロサミンの分析は下記のように行った。試料 3~5mg を Redmond の方法[28]に従い 0.5 ml の 10 M-塩酸で 90°C, 15 分間加水分解後、上述と同様、Dowex 50 (H<sup>+</sup>)カラムによって分画したアミノ糖画分を N-アセチル化, 還元, 完全アセチル化して N-アセチル・アルジトール・アセテート誘導体を調製し、GLC および GC/MS 分析により定性・定量した。内部標準物質としてマンノースを用いた。

### 2-3. 脂肪酸の分析

脂肪酸は、Haefner らの方法[29]に従い、試料 5~10 mg を 1 ml の 4M-塩酸で 100°C, 4 時間加水分解後、更に 4 M-水酸化ナトリウム 1.67 ml (終濃度: 1 M-水酸化ナトリウム)を加え引続き 100°C, 2 時間加水分解し、加水分解液を塩酸酸性とした後、クロロホルムにより脂肪酸画分を抽出し、Rietschel らの方法[30]によりジアゾメタン (0~4°C, 1 分)でメチルエステル誘導体として Table E-5 に示したプログラム 3 を用いる GLC および GC/MS 分析によって定性定量した。内部標準物質としてノナデカン酸メチルエステル(ガスクロ工業)を用いた。

中性糖、アミノ糖 および 脂肪酸の同定は、GLC における各標準物質の相対保持時間と GC/MS (日本電子 DX-300)により行った。GLC 分析における各標準物質の相対保持時間を Table E-6 (中性糖), Table E-7 (アミノ糖) および Table E-8 (脂肪酸) にそれぞれ示した。GC/MS 分析は GLC 分析と同じ条件 (Table E-5)で行い、Electron Impact Mass Spectrometry (EI-MS) はイオン化電圧 72 eV で、Chemical Ionization Mass Spectrometry (CI-MS) は反応ガスとしてイソブタンを用いてそれぞれ分

析した。中性糖，アミノ糖および脂肪酸の定量は、Table E-6, Table E-7 および Table E-8 に示した各標準物質に対する検量線を用いて行った。1875 株 LPS に含まれていた NS I・II, Hakata P-LPS に含まれていた未同定アミノ糖(AS)，ペロサミンおよびキノボサミンの定量は、ピーク面積法により行った。

Table E-6. キシロースに対する各中性糖標準物質の GLC 分析における相対保持時間

中性糖	相対保持時間	中性糖	相対保持時間
エリスロース	0.34	ガラクトース	1.48
リボース	0.82	グルコース	1.60
アラビノース	0.84	グロース	1.60
リキソース	0.84	イドース	1.84
キシロース	1.00	2-デオキシ-リボース	0.53
アロース	1.30	フコース	0.65
タロース	1.37	ラムノース	0.61
マンノース	1.40	フルクトース	1.55*

相対保持時間：キシロースのアルジトール・アセテート誘導体に対する各中性糖の同誘導体の相対保持時間。\*) キシロースの 0-アセチル-0-メチルオキシム誘導体に対するフルクトースの同誘導体の相対保持時間。分析条件：プログラム 1 (Table E-5)。

Table E-7. マンノースに対する各アミノ糖標準物質の GLC 分析における相対保持時間

アミノ糖	相対保持時間	アミノ糖	相対保持時間
マンノース	1.00	マンノサミン	2.11
グルコサミン	1.88	ペロサミン	1.06
ガラクトサミン	2.05	キノボサミン	1.08

相対保持時間：マンノースのアルジトール・アセテート誘導体に対する各アミノ糖標準物質の N-アセチル・アルジトール・アセテート誘導体の相対保持時間。分析条件：プログラム 2 (Table E-5)。

Table E-8. ノナデカン酸に対する各脂肪酸標準物質の GLC 分析における相対保持時間

脂肪酸	相対保持時間	脂肪酸	相対保持時間
デカン酸 (C10:0)	0.06	オクタデカン酸 (C18:0)	0.81
ウンデカン酸 (C11:0)	0.09	オクタデセン酸 (C18:1)	0.90
ドデカン酸 (C12:0)	0.13	ノナデカン酸 (C19:0)	1.00
トリデカン酸 (C13:0)	0.19	3-ヒドロキシ-テトラ	
テトラデカン酸 (C14:0)	0.26	デカン酸 (3-OH-C14:0)	1.21
ペンタデカン酸 (C15:0)	0.36	3-ヒドロキシ-ヘキサ	
ヘキサデカン酸 (C16:0)	0.49	デカン酸 (3-OH-C16:0)	1.69
ヘキサデセン酸 (C16:1)	0.57	3-ヒドロキシ-オクタ	
ヘプタデカン酸 (C17:0)	0.64	デカン酸 (3-OH-C18:0)	2.19

相対保持時間: ノナデカン酸のメチルエステル誘導体に対する各脂肪酸標準物質の同誘導体の相対保持時間. 分析条件: プログラム 3 (Table E-5).

#### 2-4. 呈色反応

全糖質は Dubois らのフェノール・硫酸法 [31]、ヘプトースは Osborn のシステイン・硫酸法 [32]、全リンは Allen 法の久恒らによる変法 [33]、還元糖は百瀬らの方法 [34]、全アミノ糖は Belcher らの方法 [35]、蛋白質は Lowry らの方法 [36]、2-ケト-3-デオキシオクト酸 (KDO) は Weissbach の過ヨウ素酸・チオバルビツール酸法 [37]、ウロン酸は Bitter and Muir のカルバゾール・硫酸法 [38] によりそれぞれ定量した。また、各呈色反応に供した試料溶液の濃度は、それぞれ 0.1 mg-LPS/ml, 1.0 mg-LPS/ml, 2 mg-LPS/ml-60% 過塩素酸, 0.2 mg-LPS/ml, 0.4 mg-LPS/ml, 2.0 mg-LPS/ml-1 M 水酸化ナトリウム, 5.0 mg-LPS/ml および 0.5 mg-LPS/ml である。各呈色反応の検量線は、標準物質として、フェノール・硫酸法および還元糖定量反応ではグルコース、全アミノ糖定量反応ではグルコサミン、Lowry 法では牛血清アルブミン、過ヨウ素酸・チオバルビツール酸法では KDO、全リンの定量反応ではリン酸一カリウム、およびカ

ルバゾール・硫酸法ではガラクトツロン酸を用いて作成した。

また、KDO およびウロン酸の呈色反応では、ともに対象糖以外の糖の存在によっても発色するため、反応液の吸収スペクトルを二波長分光光度計(日立 557 型)により測定し、標準物質のそれと比較した。標準物質としてのウロン酸(ガラクトツロン酸)および KDO (アンモニウム塩)はともに Sigma 社製を使用した。

## 2-5. その他の分析

全脂質は試料 10 mg を 1.5 ml の 4 M-塩酸で 100°C, 4 時間加水分解後、エーテル可溶性画分を秤量して定量した。ヘプトースの同定は、中性糖と同様に GLC により行った。標準の L-グリセロ-D-マンノヘプトースと D-グリセロ-D-マンノヘプトースは Bagdianらの方法[39]に従って調製した。

## 3. メチル化分析

単糖および多糖のメチル化は Hakomori の方法 [40] に従って行った。箱守試薬(メチルスルフィニルカルボアニオン)は、375 mg の水素化カリウム懸濁液(35%, Aldrich chemical Co.)をガスクロ用バイアル瓶にとり、3 ml の石油エーテルで 3 回洗浄し鉱油を取り除いた後、減圧下で石油エーテルを除去し、氷冷下に 2 ml のジメチルスルホキシドを加え、窒素封入した後、室温で 1 時間攪拌して調製した。メチル化分析に使用する試料および器具は、減圧下、五酸化リン上で完全に乾燥させた。反応は全て窒素封入したガスクロ用バイアル瓶中で行い、試薬の注入はガラス注射筒を用いて行った。単糖および多糖の完全メチル化は、試料 5~10 mg を 0.5~1.0 ml のジメチルスルホキシドに溶解させ、箱守試薬(0.5~1.0 ml)を加え、室温で 5 時間攪拌した後、0.5~1.0 ml のヨウ化メチルを加え更に室温で 1 時間攪拌して行った。

反応終了後、減圧下にて過量のヨウ化メチルを完全に除去した後、反

応液を 20 ml の蒸留水に懸濁させ、SEP-PAK C18 カートリッジ (Waters Associates) [41] を通過させた。同カートリッジを 20 ml の蒸留水で 2 回洗浄した後、20 ml のメタノールで溶出し、エバポレーターで濃縮乾固してメチル化糖を得た。

メチル化単糖は、少量のクロロホルムに溶解した後、直接 Table E-5 に示したプログラム 4 あるいはプログラム 5 を用いる GS/MS (CI-MS, EI-MS)により分析した。メチル化多糖は、1.0 ml の 2 M-トリフルオル酢酸で 120°C, 1 時間加水分解後、重水素化ホウ素ナトリウム (100 mg- $\text{NaBD}_4$  / 3 ml-メタノール・水混液 [1:1, v/v], 0.6 ml) で室温、一夜還元し、1 ml の無水酢酸で 100°C, 2 時間アセチル化した後、前述と同様に GC/MS により分析した。

#### 4. 過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陽性物質の分離

LPS (50 mg) を 4M 塩酸 (20 ml) で 100°C, 45 分間加水分解後、クロロホルムで脂質を除去し、その水層を減圧下、濃縮乾固した。残渣を、少量の蒸留水に溶解し、Dowex 50 ( $\text{H}^+$ ) カラム (1.5 x 20 cm) に通過させ、20 ml の蒸留水で溶出した。溶出液を減圧下濃縮乾固後、再び少量の蒸留水に溶解して Dowex 1 (酢酸型) カラム (1.5 x 20 cm) を通過させ、20 ml の蒸留水で洗浄後、15 ml の 2M 塩酸で溶出した。溶出液を減圧下、濃縮乾固し、過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陽性物質 (X) 画分を得た。得られた X は、下記のアルカリ性ホスファターゼ処理、高圧濾紙電気泳動 および GC/MS 分析等 に供した。

#### 5. 過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陽性物質のアルカリ性ホスファターゼ処理

X のアルカリ性ホスファターゼ処理は、Drewry らの方法 [42] に従い、0.05M 炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 9.6, 0.5 ml) 中でアルカリ性ホスファターゼ (8.0 units, Sigma, Type III-R) を用い、37°C, 16 時間行った。



反応終了後、100°C, 5 分間加熱処理した後、窒素気流下にて蒸発乾固して試料とし、高圧濾紙電気泳動およびメチル化分析に供した。

## 6. 高圧濾紙電気泳動

X の高圧濾紙電気泳動は、Whatmann No. 1 paper 上でピリジン/酢酸/水(10:4:86, v/v/v, pH 5.3) の溶媒系を用い、50 V/cm で 50 分間泳動した。濾紙上での X の検出は、Warren の方法[43]に従い、チオバルビツール酸試薬により行った。

ウロン酸の高圧濾紙電気泳動も上述と同様に行った。検出試薬にはアニリン・トリクロル酢酸[44]を用いた。

## 7. 過ヨウ素酸・チオバルビツール酸反応陽性物質の GC/MC 分析

LPS および LPS から分離した X を 1.0 ml の 1 M-メタノール・塩酸で 60°C, 1 時間メタノリシスした後、窒素気流下、40°C で乾固した。残渣は、0.5 ml のメタノールに溶かし、ジアゾメタンでメチル化 (0~4°C, 1 分)した後、1.0 ml のピリジン/無水酢酸(1:1, v/v)で 80°C, 30 分間加温してアセチル化した。反応終了後、減圧下に濃縮乾固し、残渣を再びメタノール中ジアゾメタンでメチル化後、Table E-5 に示したプログラム 5 を用いる GC/MS (CI-MS, EI-MS)により分析した。また、アルカリ性ホスファターゼで処理した Xを電気泳動により分取し、水素化ホウ素ナトリウム(100 mg-NaBH<sub>4</sub> /3 ml-H<sub>2</sub>O, 0.6 ml)で室温にて 3 時間還元後、箱守法[40]により完全メチル化し、プログラム 4 (Table E-5) を用いる GC/MS 分析を行った。

## 8. N-deacylation および N-acetylation

O1 コレラ菌 LPS から調製した DPS 画分の Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーにより得られた Frc. II (LPS の多糖体画分, O-polysa-

ccharide) の N-deacylation は、Perry らの方法[45]に従い、試料(200 mg) を 0.1% の水素化ホウ素ナトリウムを含む 1 M-水酸化ナトリウム溶液(10 ml)で100°C, 2 時間処理して行った。反応液は、氷冷下、2 M-塩酸で中和後、一夜、蒸留水で透析した。透析内液は、沈殿物を遠心分離により除去した後、減圧下、濃縮乾固した。その残渣を少量のピリジン/酢酸/水(10:4:1000, v/v/v)に溶解し、後述の Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーにより分画後、多糖体画分 (Frc.II) を凍結乾燥して O1 コレラ菌 N-deacylated O-polysaccharide を得た (収率 50~53%)。

O1 コレラ菌 N-deacylated O-polysaccharide の N-acetylation は、Lüderitz らの方法[27]に従い、O1 コレラ菌 N-deacylated O-polysaccharide 50 mg を 10 ml の 1%-炭酸水素ナトリウム水溶液に溶解し、300  $\mu$ l の無水酢酸を加え室温にて 1 時間攪拌して行った。N-acetylated O-polysaccharide は、上反応液を一夜蒸留水で透析した後、前述と同様に Sephadex G-50 ゲルクロマトグラフィーにより分画・調製した(収率 89~93%)。

得られた O1 コレラ菌 N-deacylated および N-acetylated O-polysaccharide は、NMR スペクトルの測定やメチル化分析等に供した。

また、O1 コレラ菌 LPS の N-deacylation と N-acetylation は下記のように行った。LPS 200 mg を上記の方法で N-deacylation した後遠心分離し、その遠心沈渣を蒸留水で洗浄後、10 ml の 0.01% トリエチルアミン水溶液に溶解させ、一夜透析した。透析内液を遠心分離し、不溶物を除去した後、凍結乾燥して O1 コレラ菌 N-deacylated LPS を得た (収率 58~63%)。更に、O1 コレラ菌 N-deacylated LPS 50 mg を上記と同様に N-acetylation した後、透析し、その内液を遠心分離して不溶物を除去した後、凍結乾燥して O1 コレラ菌 N-acetylated LPS を得た (収率 84~87%)。

得られた O1 コレラ菌 N-deacylated および N-acetylated LPS は、糖組成の分析および血清学的研究に供した。

## 9. LPS における KDO 分子の隣接糖との結合様式の検討と、リピド A バックボーンの構造確認

本実験の手順を Fig. E-1 に示した。まず、LPS の脱リン酸化[68]を行うため 150 mg の LPS を 2 ml の 40%-フッ化水素酸水溶液に溶解し 4 °C で 48 時間攪拌した後、透析した。その内液を遠心分離して不溶物を除去した後、凍結乾燥して脱リン酸-LPS を得た(収率 77.4%)。脱リン酸-LPS 50 mg を水素化ホウ素ナトリウム(100 mg- $\text{NaBH}_4$  /3 ml- $\text{H}_2\text{O}$ , 6.0 ml)で室温にて一夜還元し、脱リン酸-LPS 還元体(収率 87.8%)とした後、さらに、無水ヒドラジン(5 ml)で 100°C, 40 時間処理した。ヒドラジン処理により遊離した脂肪酸をクロロホルムで抽出した後、水溶性画分を透析し、その内液を減圧下濃縮乾固した。残渣を 20 ml の 1% 炭酸水素ナトリウム水溶液に溶解し、300  $\mu\text{l}$  の無水酢酸を加え室温にて 1 時間攪拌して N-アセチル化した。反応液を一夜透析し、その内液を遠心分離して不溶物を除去後、凍結乾燥して脱リン酸-脱脂肪酸-N-アセチル LPS 還元体を得た(収率82.4%)。脱リン酸-脱脂肪酸-N-アセチル LPS 還元体 10 mg を前述の箱守法[40]により完全メチル化し、水素化ホウ素ナトリウム(100 mg- $\text{NaBH}_4$  /3 ml-メタノール・水混液 [1:1, v/v], 2 ml)で室温にて一夜カルボキシル還元を行った後、2 ml の 0.05 M-トリフルオル酢酸で 100°C, 15 分間加水分解して LPS のリピド A バックボーン部分と多糖体部分を切断した。加水分解液を窒素気流下蒸発乾固した後、2 つに分け、一方は リピド A バックボーンの構造を検討するため 1 ml の無水酢酸で 100°C, 2 時間アセチル化した後、TableE-5 に示したプログラム 4 を用いる GC/MS 分析に供した。また他方は、KDO 分子の隣接糖との結合様式を検討するため下記のように処理した。まず、本試料を重水素化ホウ素ナトリウム(100 mg- $\text{NaBD}_4$  /3ml-メタノール・水混液[1:1, v/v], 0.6 ml)で室温にて一夜還元し、還元末端糖を重水素標識した後、1 ml の 2 M-トリフルオロ酢酸で 120°C, 1 時間加水分解した。加水分解液を窒素気流下蒸発乾固し、水素化ホウ素ナトリウム(100 mg- $\text{NaBH}_4$  /3 ml-メタノール・水混液[1:1, v/v], 0.6 ml)で室温にて 3 時間還元、無水酢酸(1 ml)

で 100°C, 2 時間アセチル化した後、Table E-5 に示したプログラム 4 を用いるGC/MS 分析を行った。

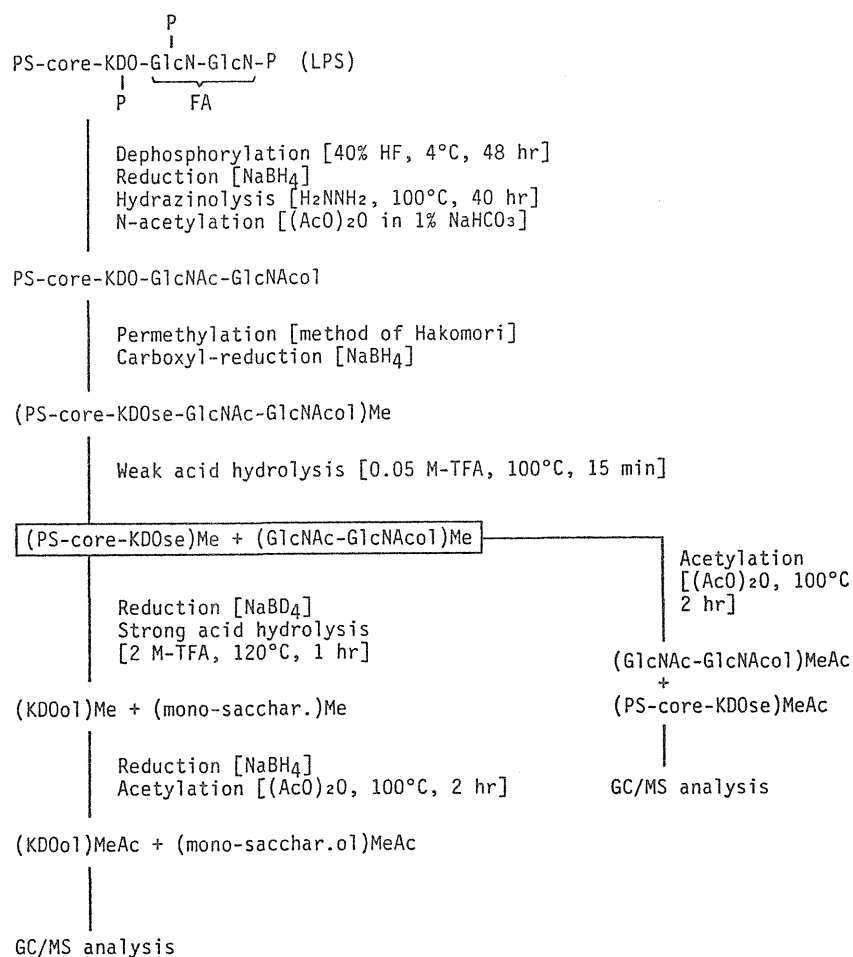


Fig. E-1. KDO 分子の結合様式の検討とリピド A バックボンの構造確認。PS; O-多糖。P; リン酸。FA; 脂肪酸。GlcNAc; N-アセチルグルコサミン。GlcNAcOl; N-アセチルグルコサミニトル。KDOse; 2-ケト-3-デオキシ-オクトース。KDOol; 3-デオキシ-オクチトル。Me; メチル。Ac; アセチル。mono-sacchar.; 単糖。mono-sacchar.ol; 単糖還元体。

## 10. ゲルクロマトグラフィー

DPS 画分のゲルクロマトグラフィーは、Sephadex G-50 カラム (2.6 x 100 cm, Pharmacia Fine Chemicals) を用い、ピリジン/酢酸/水(10:4:1000, v/v/v)で、39 ml/hr の流速で溶出し、オートマティックフラクションコレクターにより 3 ml の画分に分画した。

N-deacylated および N-acetylated O-polysaccharide のゲルクロマトグラフィーは、Sephadex G-50 カラム (1.6 x 70 cm, Pharmacia Fine Chemicals)を用い、前述と同様の溶出液で、10 ml/hr の流速で溶出し、1 ml の画分に分画した。

溶出パターンは、示差屈折率計(島津 RID-6A 型)で測定するとともに、各画分の全糖質量および全リン量を分析することにより追跡した。

## 11. ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

LPSのドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は Laemmli らの方法[69]に従って行った。0.4~0.8 mg/ml の LPS 溶液 100  $\mu$ l に 2% SDS, 20% シュクロース, 1% 2-メルカプトエタノール および 0.001% ブロモフェノールブルーを含む 0.1 M-Tris/HCl buffer (pH 6.8) 100  $\mu$ l を加え、100°C, 5 分間加熱処理した後、この 10  $\mu$ l を SDS-PAGE に供した。泳動用ゲルとしては、14% アクリルアミド分離ゲルと 4%アクリルアミド重層ゲルから成るスラブゲル(13.5 cm x 12 cm x 1 mm)を用いた。14% アクリルアミド分離ゲルは、30% アクリルアミド 9.3 ml, 1.875 M-Tris/HCl 緩衝液(pH 8.8) 4.0 ml, 2% SDS 1.0 ml および 蒸留水 5.5 ml の混液に 10% 過硫酸アンモニウム 0.2 ml と N,N,N',N'-tetra-methyl-ethylene-diamine (TEMED) 20  $\mu$ l を加えて作製した。4% アクリルアミド重層ゲルは、30% アクリルアミド 1.3 ml, 0.625 M-Tris/HCl buffer(pH 6.8) 2.0 ml, 2% SDS 0.5 ml および 蒸留水 6.1 ml の混液に 10%-過硫酸アンモニウム 0.1 ml と TEMED 10  $\mu$ l を加えて作製した。泳動用 buffer には、0.96 M-グリシンと 0.5 % SDS を含

む 0.125 M-Tris buffer (pH 8.3)を用い、30 mA/ゲルの定電流にて約 3 時間泳動した。泳動終了後、重層ゲルを除去し、分離ゲルをエタノール/酢酸/水 (40:10:50, v/v/v) 固定液 (400 ml)に移し、ロータリシェーカー (TAITEC)を用いて 30 分間振盪した。固定液をアスピレーターにより吸引・除去した後、14%-過ヨウ素酸/エタノール/酢酸/水 (5:40:5:50, v/v/v) 混液 400 ml を注ぎ 5 分間振盪した後、蒸留水で各 15 分、6 回洗浄した。ゲル上の LPS 成分の染色は、Tasi と Frascch の方法[70]に従い銀染色により行った。染色には銀染色用試薬キット (第一化学薬品)を使用した。

## 12. 薄層クロマトグラフィー

ペロサミンの薄層クロマトグラフィー (TLC) は、ブタノール/ピリジン/水/酢酸 (6:4:3:1, v/v/v/v) の溶媒系を用い、Avicel プレート (フナコシ薬品) 上で行った。標準物質にはグルコサミン (Sigma 社製) を用い、発色剤には 0.3% ニンヒドリンの 95%-エタノール溶液 [46] を使用した。試料は下記のように調製した。LPS 5 mg を 0.5 ml の 10 M-塩酸で 90°C, 15 分間加水分解後、減圧した濃縮乾固し、残渣を 2 ml の 0.01 M-塩酸に溶解後 Dowex 50 (H<sup>+</sup>) カラムに等した。カラムを 20 ml の蒸留水で洗浄後、15 ml の 2 M-塩酸で溶出し、溶出液を減圧下濃縮乾固して試料とした。

## 13. 核磁気共鳴スペクトルの測定

O1 コレラ菌 O-polysaccharide および Hakata 株 O-polysaccharide の核磁気共鳴スペクトル (NMR) の測定は下記のように行った。

### 13-1. Carbon-13 NMR (<sup>13</sup>C-NMR)

重水 (min. 99.8%, Merck) で凍結乾燥した試料を、再び重水に溶解し、クロマト用グラスウールで濾過し浮遊物を除去後、5 mm φ の測定管に封入

した(液高 4 cm)。スペクトルの測定は、日本電子 GX-270 (フーリエ変換 NMR 装置)を用い、共鳴周波数 67.80 MHz, 測定温度 25.0°C, pD 7.0 で、proton decoupling (測定モード: SGBCM, Single pulse bilevel complete decoupling) および proton coupling (測定モード: SGNOE, Single pulsehetero decoupling with NOE) の手法により行った。内部標準には 1,4-ジオキサン(和光純薬工業)を用い、これを 67.40 ppm とした。

### 13-2. Proton NMR ( $^1\text{H}$ -NMR)

測定用試料は前述と同様に調製した。スペクトルの測定は、同装置を用い、共鳴周波数 270.05 MHz, 測定温度 25.0°C, pD 7.0 で HOD のシグナルを 4.65 ppm に固定して行った(測定モード: SGNON, Single pulse nondecoupling)。

## 第 2 章に関する実験

### 1. 抗血清の調製

本研究に使用した菌株に対する抗 O-血清は、島田らの方法[47]に従い、家兎を免疫して調製した。ハートインフュージョンあるいは食塩添加ハートインフュージョン培地で 16 時間、至適温度で培養した各菌体を滅菌生理食塩水に懸濁し、100°C, 2 時間加熱した後、滅菌生理食塩水で 3 回洗浄した。洗浄菌体は、620 nm における濁度が 1.0 ( $2 \times 10^8$  個/ml) になるように滅菌生理食塩水に懸濁させ、その 0.5 ml, 1.0 ml, 2.0 ml, 4.0 ml をそれぞれ 4 日間隔で計 4 回家兎に静脈注射した。最終投与から 1 週間後に心臓穿刺により全採血し抗血清を得た。抗血清の調製の際に使用する器具は、全て、乾熱滅菌(180°C, 2 時間)あるいはオートクレーブ(121°C, 2 気圧, 20 分)することにより滅菌した。

O1 コレラ菌の O-抗原に対する各因子血清(A, B, C)と Vibrio bio-

serogroup 1875, V. fluvialis 181-86 Kobe および V. cholerae bio-serogroup Hakata の O-抗原に対する各因子血清 (D+E, E, F) は、島田俊雄・坂崎利一両博士(国立予防衛生研究所)から分与された。菌体凝集反応における A, B, C, D+E, E および F 因子血清の力価は、それぞれ320~640 倍, 320~640 倍, 20~80 倍, 320~640 倍, 80~160 倍 および 1,280 倍であった[6,7,9]。

## 2. 受身溶血および受身溶血阻止反応

受身溶血 (passive hemolysis, PH) および受身溶血阻止 (passive hemolysis inhibition, PHI) 反応は久恒らの方法[48]に従って行った。両反応に使用した感作血球は、ヒツジ赤血球 (SRBC) packed cell (0.1 ml) に 250  $\mu$ g/ml のアルカリ処理 (0.25M 水酸化ナトリウム, 56°C, 1 時間) LPS [49] (0.6 ml) を加え、37°C, 30 分間インキュベートして作成した。洗浄液および稀釈液としては、両反応系ともに、0.15 mM 塩化カルシウム, 0.5 mM 塩化マグネシウム および 0.83% 食塩を含む 0.25 mM バルビツール緩衝液 (pH7.4) を用いた。

### 2-1. PH 反応

抗血清 (100 倍稀釈液) の 2 倍稀釈列 0.2 ml に 0.2 ml の 0.5% アルカリ処理 LPS 感作 SRBC 浮遊液とモルモット補体 (10 倍稀釈, 極東製薬工業) 20  $\mu$ l を加え、37°C, 30 分間インキュベートした。反応後、1 ml の稀釈液を加え、遠心分離し、上清の 413 nm における吸光度を測定して % 溶血を求めた。溶血対照には稀釈液の代りに蒸留水を、また、非溶血対照には抗血清の代りに稀釈液を用いた。縦軸に溶血 %, 横軸に抗血清の稀釈倍率をとり、溶血曲線を作成し、LPS 感作 SRBC に対する抗血清の 50% 溶血価を求めた。



## 2-2. PHI 反応

抗血清 0.1 ml に種々の濃度の inhibitor (LPS) 溶液 0.1 ml を加え、37°C, 30 分間インキュベートした後、感作 SRBC 浮遊液(0.2 ml)とモルモット補体 (20  $\mu$ l) を加え、更に、37°C, 30 分間インキュベートした。反応後、前述と同様に、413 nm における吸光度を測定した。抗血清は 100% 溶血を示す最大稀釈率のものを使用した。% 溶血阻止は次式により求め、各濃度の inhibitor 溶液の % 溶血阻止の値をグラフ用紙にプロットして 50% 溶血阻止濃度を求めた。対照としては、抗血清を含まない補体対照と inhibitor を含まない溶血対照を用いた。

$$\% \text{ 溶血阻止} = \left( 1 - \frac{\text{ABS 413 [S]} - \text{ABS 413 [C]}}{\text{ABS 413 [H]} - \text{ABS 413 [C]}} \right) \times 100$$

ABS 413 [S] : 試料の 413 nm における吸光度

ABS 413 [H] : 溶血対照の 413 nm における吸光度

ABS 413 [C] : 補体対照の 413 nm における吸光度

A 因子に関する溶血系は、O1 コレラ菌 Ogawa LPS および Inaba LPS 感作 SRBC と A 因子血清、B 因子の溶血系は、Ogawa LPS および 1875 Original LPS 感作 SRBC と B 因子血清を用いて作製した。また、D・E と E 因子の溶血系は、それぞれ 1875 Original LPS, 1875 Variant LPS および Kobe W-LPS 感作 SRBC と D・E 因子血清、同感作 SRBC と E 因子血清を用いて作製した。D, F 因子に関する溶血系は、それぞれ Haka-ta P-LPS感作 SRBC と D・E 因子血清、同感作 SRBC と F 因子血清を用いて作製した。C 因子血清は、C 因子を持つ菌株から分離・精製した LPS で感作した SRBC を溶血しなかったことから、C 因子に関する溶血系は作製できなかった。

### 3. その他の実験法

O1 コレラ菌 LPS の化学修飾は、第 1 章に関する実験・7 に準じて行った。また、化学修飾 O1 コレラ菌 LPS の糖組成の分析は、第 1 章に関する実験・2 に準じて行った。

[引用文献]

1. Aumann, P. and Schubert, R.H.W. (1984). In: Krieg, N.R. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 516-550. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
2. Kabeshima, I. (1913). *日本衛生学雑誌* 9, 61.
3. Sakazaki, R. and Tamura, K. (1971). *Japan. J. Med. cal Sci. Biol.*, 4, 93-100.
4. Finkelstein, R.A. (1973). *CRC Cri. Rev. Microbiol.*, 2, 553-623.
5. 島田俊雄, 坂崎利一, 小迫芳正. (1982). *感染症学雑誌* 56, 1017-1024.
6. Shimada, T., Sakazaki, R. and Oue, M. (1987). *J. Appl. Bacteriol.*, 62, 453-456.
7. Shimada, T., Sakazaki, R. and Tobita, K. (1987). *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 40, 153-157.
8. Shimada, T. and Sakazaki, R. (1983). *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 36, 315-323.
9. Shimada, T. and Sakazaki, R. (1988). *J. Appl. Bacteriol.*, 64, 141-144.
10. Willkinson, S.G. (1977). In: Sutherland, I.W. (ed.), *Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell*, pp. 97-175. Academic Press, New York.
11. Lüderitz, O., Freudenberg, M.A., Galanos, C., Lehman, V., Rietschel, E.T and Shaw, D.H. (1982). *Current Topics in Membranes and Transport* 17, 79-151.
12. Lüderitz, O., Westphal, O., Staub, A.M. and Nikaido, H. (1971).

- In: Weinbaum, G., Kadis, S. and Ajl, S.J. (eds.), Microbial Toxins, vol. 4, pp. 145-233. Academic Press, New York.
13. Westphal, O., Jann, K. and Himmelsbach, K. (1983). In: Ishizaka, K., Kallos, P., Waksman, B.H. and Weck, A.L. (eds.), Progress in Allergy, vol. 33, pp. 9-39. Karger, Basel.
  14. Kauffman, F., Kruger, L., Lüderitz, O. and Westphal, O. (1961). Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, Abt 1. Originale 182, 57.
  15. Redmond, J.W. (1979). Biochim. Biophys. Acta 584, 346-352.
  16. Kenne, L., Lindberg, B. and Unger, P. (1979). Carbohydr. Res., 68, C14-C16.
  17. Kenne, L., Lindberg, B. and Unger, P. (1982). Carbohydr. Research 100, 341-349.
  18. Hisatsune, K., Yamamoto, F. and Kondo, S. (1985). In: Kuwahara, S. and Pierce, N.F. (eds.), Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas, vol. 2, pp. 17-24. KTK Scientific Publishers, Tokyo.
  19. Kondo, S., Iguchi, T. and Hisatsune, K. (1988). J. Gen. Microbiol., 134, 1699-1705.
  20. Galanos, C., Lüderitz, O. and Westphal, O. (1969). Eur. J. Biochem., 59, 277-280.
  21. Westphal, O., Lüderitz, O. and Bister, R. (1952). Z. Naturforsch. 7b, 148-155.
  22. Westphal, O. and Jann, K. (1966). Methods in Carbohydrate Chemistry 5, 83-91.
  23. Galanos, C., Rietschel, E.T., Lüderitz, O. and Westphal, O. (1971). Eur. J. Biochem., 19, 143-152.

24. Laine, R.A., Stelner, K. and Hakomori, S. (1974). In: Korn, E.E. (ed.), Methods in Membrane Biology, vol. 2, pp. 228-244. Plenum Press, New York.
25. Mawhinney, T., Feather, M. Martinetz, R.R. and Barbero, G.J. (1979). Carbohydr. Res., 75, C21-C23.
26. Wheat, R.W. (1969). In: Neufeld, E.F. and Ginsbrug, V. (eds.), Methods in Enzymology, vol. 8, pp. 60-75. Academic Press, New York.
27. Lüderitz, O., Ruschmann, E., Westphal, O., Raff, R. and Randall, R.J. (1967). J. Bacteriol., 93, 1681-1687.
28. Redmond, J.W. (1975). FEBS lett., 50, 147-149.
29. Haeffner, N., Chaby, R. and Szabo, L. (1977). Eur. J. Biochem., 77, 535-544.
30. Rietschel, E.T., Gottert, H., Lüderitz, O. and Westphal, O. (1972). Eur. J. Biochem., 28, 166-173.
31. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Gebers, P.A. and Smith, F. (1956). Anal. Chem., 28, 350-356.
32. Osborn, M.J. (1963). Proc. Natl. Acad. Sci., 50, 499-506.
33. Hisatsune, K., DeCourcy, S.U.Jr. and Mudd, S. (1967). Biochemistry 6, 586-594.
34. Momose, T., Mukai, Y. and Watanabe, M. (1960). Talanta, 5, 275.
35. Belcher, R. Nutten, A.J. and Sambrook, C.M. (1954). Analyst 79, 201.
36. Lowry, O.H., Rosebrough, N.F., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). J. Biol. Chem., 193, 265.

37. Weissbach, A. and Hurwitz, J. (1959). J. Biol. Chem., 234, 705-709.
38. Bitter, T. and Muir, H.M. (1962). Anal. Biochem., 4, 330-334.
39. Bagdian, G., Droge, W., Kotelko, K., Luderitz, O. and Westphal, O. (1966). Biochem. Z., 344, 197-211.
40. Hakomori, S. (1964). J. Biochem., 51, 205-208.
41. Waeghe, T.J., Darvill, A.G., McNeil, M. and Albersheim, P. (1983). Carbohydr. Res., 123, 281-304.
42. Drewry, D.T., Gray, G.M. and Wilkinson, S.G. (1971). Eur. J. Biochem., 21, 400-403.
43. Warren, L. (1960). Nature 186, 237.
44. Gee, M. and McCredy, R.M. (1957). Anal. Chem., 29, 257.
45. Caroff, M., Bundle, D.R. and Perry, M.B. (1984). Eur. J. Biochem., 139, 195-200.
46. Aminoff, D. and Morgan, W.T.J. (1960). Nature 162, 579.
47. Shimada, T. and Sakazaki, R. (1973). Japan. J. Med. Sci. Biol., 26, 155-160.
48. Hisatsune, K., Kondo, S. and Kobayashi, K. (1978). Japan. J. Med. Sci. Biol., 31, 181-184.
49. Galanos, C., Rietschel, E.T., Luderitz, O. and Westphal, O. (1971). Eur. J. Biochem., 19, 143-152.
50. Shands, J.W.Jr. (1971). In: Weinbaum, G., Kadis, S. and Ajl, S.J. (eds.), Microbial Toxins, vol. 4, pp. 127-144. Academic Press, New York.
51. Nichols, J.C., Murphy, J.R., Robb, M., Echeverria, P. and

- Craig, J.P. (1978). In: "Symposium on Cholera, Karatsu", Proceedings of 14th Conference US-Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera Panel, pp. 192-199.
52. Hisatsune, K., Kondo, S., Iguchi, T., Ohtomo, N., Nichols, J.C., Murphy, J.R. and Takeya, K. (1980). In: "Symposium on Cholera, Nara", Proceedings of 16th US-Japan Joint Conference on Cholera, pp. 204-213.
  53. Kondo, S., Haishima, Y. and Hisatsune, K. (1988). In: Kuwahara, S. and Pierce N.F. (eds.), Advances in Research on cholera and related diarrheas, vol. 4, pp. 71-76. KTK Scientific Publishers, Tokyo.
  54. Chaby, R. and Szabo, L. (1975). Eur. J. Biochem. 59, 277-280.
  55. 久恒和仁, 林 雅裕, 鮎島由二, 近藤誠一. (1988). 第 35 回毒素シンポジウム予講集, pp. 70-75.
  56. Kondo, S. and Hisatsune, K. (1988). Microbiol. Immunol., 32, 907-915.
  57. 井口毅裕, 鮎島由二, 近藤誠一, 久恒和仁. (1988). 第 35 回毒素シンポジウム予講集, pp. 5-10.
  58. 阿武喜美子, 瀬野信子. (1984). 糖化学の基礎, pp. 79-81. 講談社サイエンティフィク
  59. Bock, K., Lundt, I. and Pedersen, C. (1973). Tetrahedron Lett., 13, 1037-1040.
  60. Bock, K. and Pedersen, C. (1974). J. Chem. Soc. Perkin Trans., 2, 293-297.
  61. Choy, Y.M. and Dutton, G.G.A. (1973). Can. J. Chem., 51, 198-207.
  62. Hisatsune, K., Iguchi, T. and Kondo, S. (1988). In: Kuwahara, S. and Pierce, N.F. (eds.), Advances in Research on Cholera

and Related Diarrheas, vol. 5, in press.

63. Hisatsune, K., Kondo, S., Iguchi, T., Yamamoto, F., Inaguma, M., Kokubo, S. and Arai, S. (1984). In: Homma, J.Y., Kanegasaki, S., Lüderitz, O., Shiba, T. and Westphal, O. (eds.), Bacterial Endotoxin. Chemical, Biological and Clinical Aspects, pp. 187-201. Verlag Chemie, Basel.
64. Brade, H., Moll, H. and Rietschel, E.T. (1985). Biomed. Mass Spectr., 12, 602-609.
65. Unger, F.M. (1981). In: Tripson, R.S. and Horton, D. (eds.), Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, vol. 38, pp. 323-388. Academic Press, New York.
66. Brade, H. (1985). J. Bacteriol., 161, 795-798.
67. 橋本 智, 南 明宏, 城敬一郎, 阿部久夫, 北村治志, 西淵光昭, 有田美和子, 本田武司, 三輪谷俊夫. (1988). 日本細菌学雑誌 43, 189.
68. Lipkin, D., Phillips, B.E. and Abrell, J.W. (1969). J. Org. Chem., 34, 1539-1547.
69. Laemmli, U.K. (1970). Nature (London) 227, 680-685.
70. Tsai, C.M. and Frasch, C.E. (1982). Anal. Biochem., 119, 115-119.
71. Jann, B., Reske, K., and Jann, K. (1975). Eur. J. Biochem., 60, 239-246.
72. Jann, K. and Jann, B. (1984). In: Rietschel E. Th. (ed.), Handbook of Endotoxin, vol. 1, pp. 138-186.
73. Rietschel, E.Th., Wollenweber, H.W., Brade, H., Zähringer, U., Lindner, B., Seydel, U., Bradaczek, H., Barnickel, G., Labischinski, H. and Giesbrecht P. (1984). In: Rietschel, E. Th. (ed.), Handbook of Endotoxin, vol 1, pp. 187-220.



74. 天野憲一，水尻 栄，福士主計．(1988)． 日本細菌学雑誌 43，911-916.

